

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA ELIZABETH HUSCH

**SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E  
VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Euschistus heros* (F., 1798) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE)**

CURITIBA

2016

PATRICIA ELIZABETH HUSCH

**SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS, ATIVIDADE ENZIMATICA E  
VARIABILIDADE GENETICA EM *Euschistus heros* (F., 1798) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE)**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

CURITIBA

2016

PATRICIA ELIZABETH HUSCH

"SUSCETIBILIDADE A INSETICIDAS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E  
VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Euschistus heros* (F., 1798) (HEMIPTERA:  
PENTATOMIDAE)"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em  
Ciências", no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de  
Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela  
Comissão formada pelos professores:



---

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez (Orientador)  
(Embrapa Londrina-PR)



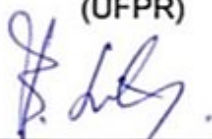
---

Prof. Dr. Celso Omoto  
(ESALQ/USP)



---

Prof. Dr. Luís Amilton Foerster (UFPR)  
(UFPR)



---

Prof. Dr. Bráulio dos Santos  
(UFPR)



---

Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva  
(UFPR)

Curitiba, 19 de fevereiro de 2016.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais  
Tilberto Henrique Husch e Elizabeth Janete  
Vrisman Husch, que com todo amor e  
dedicação sempre me orientaram aos estudos,  
ao meu eterno namorado Fabiano Meira de  
Moura Luz, que sempre me apoiou e deu  
força, Ao meu irmão Henrique Adriano Husch,  
minha cunhada irmã Ana Janaina de Camargo  
e meu sobrinho Davi e essa conquista não seria  
a mesma sem vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, com ênfase em Entomologia pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), por conceder a estrutura física e disponibilização de materiais necessários para realização dos experimentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Daniel Ricardo Sosa-Gómez, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua orientação e confiança nesses seis anos de pós-graduação, mestrado e doutorado, foi capaz de me fazer trilhar por um crescimento profissional. Toda a minha admiração pelo seu trabalho com o qual se dedica com exímio profissionalismo e determinação. É um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão maravilhosas como você.

À minha querida amiga Doutora Maria Cristina Neves de Oliveira pela ajuda na estatística e principalmente pelos conselhos e incentivo para que eu pudesse sempre seguir em frente.

Ao Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA) do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, principalmente a meu amigo Dhiego Gomes Ferreira e à Professora Doutora Silvia Helena Sofia pelo auxílio no desenvolvimento das análises moleculares.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA) pertence ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), principalmente aos amigos Luciana Fernandes de Oliveira, Carlos Eduardo Vieira e à Professora Doutora Cláudia Bueno dos Reis Martinez pelo auxílio no desenvolvimento das análises bioquímicas.

À Professora Doutora Karina Lucas da Silva-Brandão e a colega Noemy Seraphim pelos ensinamentos e ajuda nas análises moleculares.

À minha amiga Engenheira Agrônoma Alessandra Benatto pelo auxílio na formatação de minha tese.

Aos meus amigos da Embrapa Soja, Fábio Paro, Ivanilda L. Soldório, Sérgio H. da Silva, em especial ao Jovenil José da Silva e José Jairo da Silva pelo auxílio no desenvolvimento de meu trabalho ao longo desses quatro anos.

À equipe de campo da Embrapa Soja, Oriverto Tonon, Adriano dos Santos Dalben, Wilson Pozenatto e Valter Maimone (in memoriam) pela ajuda nas coletas de percevejos.

Aos produtores que cederam suas áreas para coleta de percevejos, em especial ao Jan F. Loman.

Aos meus amigos Silvia A. C. Yano, Lucas N. Wisch, Jibran F. Piña, Gizele R. Baldo Juliane A. Schneider, pelo incentivo, pelas discussões técnicas, pelos conselhos, e pela ajuda prática para que este trabalho fosse concluído.

A todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na conclusão deste trabalho, colaboraram com informações, críticas, incentivo e sugestões ao longo deste curso, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

*Euschistus heros* (Fabricius, 1794) está entre as principais pragas da cultura da soja, com distribuição abundante desde o norte do Paraná até o Brasil Central. Isso levou esse inseto praga a ser um dos principais alvos nas aplicações de inseticidas durante o período de safra, o que tem ocasionado problemas de resistência. Frente a este cenário e visando contribuir com informações que auxiliem para um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP) mais efetivo, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a suscetibilidade de populações de *E. heros*, determinar o perfil bioquímico de enzimas de metabolização e analisar a dose-resposta aos princípios ativos acefato, tiametoxam, lambda-cialotrina e à mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina, bem como realizar o estudo da diversidade e estrutura genética de populações desta espécie, com base em oito locos microssatélites. Durante as análises de suscetibilidade para a mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina [concentração diagnóstica de 0,0846 e 0,0636 µg ingrediente ativo (i.a.) por percevejo adulto], foram detectadas diferenças significativas entre as populações com mortalidade inferior a 44,4% (Arapoti-PR, Londrina-PR, Iguaraçu-PR, Sertaneja-PR, Pedrinhas Paulista-SP, Palmital-SP e Santa Helena de Goiás-GO) e a população de referência. Em relação ao acefato, com o uso da concentração diagnóstica de 7,1 µg de i.a.adulto<sup>-1</sup>, todas as populações com mortalidade  $\leq 79\%$  (Bela Vista do Paraíso-PR, Iguaraçu-PR, Santo Antônio da Platina-PR, Sertaneja-PR, Cândido Mota-SP, Iepê-SP, Nantes-SP, Palmital-SP e Pedrinhas Paulista-SP) diferiram significativamente da população de referência. As análises enzimáticas indicaram alta atividade de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase e glutatona-S-transferase para a população de Cândido Mota-SP. Esta mesma população apresentou resistência ao acefato com taxa de 11,3 vezes na avaliação de dose-resposta. Em contrapartida, a população de Pedrinhas Paulista-SP apresentou redução da suscetibilidade para lambda-cialotrina, com resistência de 6,0 vezes, e a maior atividade da 7-etoxicumarina-O-desetilase. Em um total de 243 indivíduos genotipados, foram detectados elevados níveis de diversidade, com média de heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) de 0,831 a 0,916. Exceto pela amostra da Região Nordeste do Brasil (estado da Bahia), os valores de  $\Phi_{ST}$  obtidos por diferenciação populacional par a par foram baixos ou não significativos (0,000 a 0,045), indicando ausência de diferenciação genética entre essas populações. Os resultados mostram a necessidade de se manter o monitoramento das populações de *E. heros* com problemas de resistência.

Palavras-chave: Percevejo marrom. Suscetibilidade. Análise bioquímica. Dose-resposta. Diversidade genética.

## ABSTRACT

*Euschistus heros* (Fabricius, 1794) is among the major soybean pests, with abundant distribution from the north of Paraná to Central Brazil. This led this insect pest to become one of the main targets of insecticide applications during the growing season, which has been causing resistance. Due to this scenario and aiming to contribute with information to help implement a more effective integrated pest management (IPM) program, the goals of the present study were to assess the susceptibility of *E. heros* populations, determine the biochemical profile of metabolic enzymes and analyze the dose-response to the active principles acephate, thiamethoxam, lambda-cyhalothrin, and the mixture of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin, as well as carry out the study of genetic diversity and structure of populations of this species, based on eight microsatellite loci. During the analyzes of susceptibility to the mixture of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin [diagnostic concentration of 0.0846 and 0.0636 µg active ingredient (a.i.) per adult stink bug], significant differences were detected among the populations with mortality rate inferior to 44.4% (Arapoti-PR, Londrina-PR, Iguaçu-PR, Sertaneja-PR, Pedrinhas Paulista-SP, Palmital-SP, and Santa Helena de Goiás-GO) and the reference population. Regarding acephate, using the diagnostic concentration of 7.1 µg a.i.adult<sup>-1</sup>, all the populations with mortality rate ≤ 79% (Bela Vista do Paraíso-PR, Iguaçu-PR, Santo Antônio da Platina-PR, Sertaneja-PR, Cândido Mota-SP, Iepê-SP, Nantes-SP, Palmital-SP, and Pedrinhas Paulista-SP) significantly differed from the reference population. Enzyme analyzes indicated high activity of α and β-esterase and glutathione-S-transferase in the population from Cândido Mota-SP. The same population exhibited 11.3-fold resistance to acephate in the dose-response assessment. Contrastively, the population from Pedrinhas Paulista-SP exhibited a decrease in susceptibility for lambda-cyhalothrin, with 6.0-fold resistance, and the highest activity of *O*-dealquase 7-etoxicumarina. Among a total of 243 genotyped individuals, high levels of diversity were detected, with an average expected heterozygosity ( $H_E$ ) ranging from 0.831 to 0.916. Except for the sample from the Northeast Region of Brazil (state of Bahia), the values of  $\Phi_{ST}$  obtained by pairwise population differentiation were low or non-significant (0.000 to 0.045), indicating lack of genetic differentiation among these populations. The results point to the need of monitoring populations of *E. heros* presenting resistance.

Keywords: Neotropical brown stink bug. Susceptibility. Biochemical analysis. Dose-response. Genetic diversity.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – (a) MICROAPLICADOR (Burkard Manufacturing Co. Ltd. Rickmansworth, Hertfordshire, WD31PJ, England); (b) DOSADOR; (c) MICROAPLICAÇÃO TÓPICA; (d) FRASCOS ESTERILIZADOS E VAGENS DE FEIJÃO ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) COMO ALIMENTO APÓS APLICAÇÃO. ....	24
FIGURA 1.2 – LOCALIDADES DE COLETA DE <i>E. heros</i> . ....	25
FIGURA 1.3 – GRÁFICO REPRESENTANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERASE- $\alpha$ E $\beta$ (NMOL $\alpha$ E $\beta$ -NAFTOL.MIN <sup>-1</sup> ) E GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – GST ( $\mu$ M) DE NOVE POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> . ...	34
FIGURA 1.4 – GRÁFICO REPRESENTANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE – AChE (NMOL DTNB.MIN <sup>-1</sup> .MG DE PROTEÍNA <sup>-1</sup> ) E 7-ETOXICUMARINA-O-DESETILASE – ECOD (NMOL HIDROXICUMARINA.MIN <sup>-1</sup> .MG DE VÍSCERA <sup>-1</sup> ) DE OITO POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> . ....	35
FIGURA 2.1 – PONTOS DE COLETA DE <i>E. heros</i> ; (A) ESTADOS BRASILEIROS ONDE FORAM REALIZADAS COLETAS; (B) DESTAQUE DOS PRINCIPAIS PONTOS AMOSTRADOS, COM ÊNFASE NO ESTADO DO PARANÁ; (C)1 PRINCIPAIS PONTOS DE COLETA DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ; (D)2 PONTOS AMOSTRADOS NO MUNICÍPIO DE ARAPOTI-PR. ....	49
FIGURA 2.2 – (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DADOS PARA ESTIMAR O NÚMERO DE $K$ ( $K=2$ ); (B) BASEADO NO VALOR DE $\Delta K$ (EVANNO <i>et al.</i> , 2005) E DA MÉDIA DE LIKELIHOOD $L(K)$ ; (C) STRUCTURE BAR REPRESENTANDO OS RESULTADOS DA ANÁLISE BAYESIANA PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE <i>E. heros</i> ; CADA COLUNA REPRESENTA UM INDIVÍDUO E AS CORES (AZUL E LARANJA) INDICAM A PROPORÇÃO RELATIVA DO GENOMA DE CADA INDIVÍDUO PERTENCER A UM DOS CLUSTERS ( $K$ ). ....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE <i>Euschistus heros</i> . (CONTINUA) .....	22
TABELA 1.2 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS OITO POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> UTILIZADAS NOS BIOENSAIOS E ANÁLISES ENZIMÁTICAS. ....	26
TABELA 1.3 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$ ERRO PADRÃO – EP) DE SUBPOPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> , TRATADAS COM 0,15 $\mu$ g DE TIAMETOXAM (0,0846 $\mu$ g) + LAMBDA-CIALOTRINA (0,0636 $\mu$ g), POR ADULTO <sup>1</sup> . (CONTINUA) .....	29
TABELA 1.4 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$ ERRO PADRÃO – EP) DE POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> , TRATADAS COM 7,1 $\mu$ g DE ACEFATO, POR ADULTO <sup>1</sup> . (CONTINUAÇÃO).....	30
TABELA 1.5 – BIOENSAIOS DE DOSE-RESPOSTA AO ACEFATO, LAMBDA- CIALOTRINA+THIAMETOXAM, LAMBDA-CIALOTRINA E THIAMETOXAM, EM POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> COM APLICAÇÕES TÓPICAS DE DOSES UTILIZADAS PARA CAUSAR MORTALIDADES PRÓXIMAS A 90%. (CONTINUAÇÃO) .....	32
TABELA 2.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> . ....	47
TABELA 2.2 – DESCRIÇÃO DE OITO LOCOS MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS ISOLADOS PARA A O PERCEVEJO <i>E. heros</i> E RESULTADOS PARA CADA UM DOS PRIMERS FLANQUEADORES. ....	50
TABELA 2.3 – PARÂMETROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>E. heros</i> , OBTIDOS A PARTIR DE OITO MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	54
TABELA 2.4 – TESTE DE GARGALOS GENÉTICOS RECENTES (BOTTLENECK) PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE <i>E. heros</i> . TESTE DE WILCOXON SIGN-RANK PARA EXCESSO DE HETEROZIGOSIDADE E TESTE MODE-SHIFT PARA PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS. ....	55
TABELA 2.5 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE <i>E. heros</i> , ANALISADAS COM BASE EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES, MOSTRANDO A PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO ENTRE OS INDIVÍDUOS, POPULAÇÕES E DENTRO DAS	

POPULAÇÕES. ÍNDICE $\Phi_{ST}$ – DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES. ....	56
TABELA 2.6 – DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA PAR A PAR $\Phi_{ST}$ PARA DADOS DE MICROSSATÉLITES. OBTIDA PARA AMOSTRAS DE <i>E. heros</i> DOS PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES DE SOJA DO BRASIL (PARÂMETRO BASEADO NAS ESTATÍSTICAS F DE WRIGHT, (WRIGHT, 1965)). ....	59
TABELA 2.7 – TAMANHO POPULACIONAL EFETIVO ( $\Theta$ ) E FLUXO GÊNICO ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>E. heros</i> , ESTIMADOS A PARTIR DO PROGRAMA MIGRATE-N. MIGRAÇÃO ESTIMADA A PARTIR DO ÍNDICE M ( $M = m/\mu$ ) MULTIPLICADO PELO $\Theta$ . ....	60

## SUMÁRIO

RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	07
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
REFERÊNCIAS .....	14
CAPÍTULO 1 .....	17
ANÁLISES BIOQUÍMICAS, DE SUSCETIBILIDADE E DE DOSE-RESPOSTA A INSETICIDAS EM POPULAÇÕES DE <i>Euschistus heros</i> (F., 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE).....	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT .....	19
1.1 INTRODUÇÃO .....	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
1.2.1 Populações de <i>E. heros</i> .....	22
1.2.2 Bioensaios de suscetibilidade de <i>E. heros</i> à inseticidas .....	23
1.2.3 Análise de suscetibilidade .....	24
1.2.4 Populações de <i>E. heros</i> utilizados nos bioensaios e análises enzimáticas .....	24
1.2.5 Análises de dose-resposta das populações de <i>E. heros</i> .....	25
1.2.6 Análises bioquímicas das populações de <i>E. heros</i> .....	26
1.2.6.1 Amostras.....	26
1.2.6.2 Acetilcolinesterase .....	26
1.2.6.3 Citocromo P450 Monooxigenase .....	27
1.2.6.4 Esterases alfa e beta ( $\alpha$ e $\beta$ -esterase) .....	27
1.2.6.5 Glutathione-S-transferase.....	28
1.2.6.6 Proteínas totais .....	28
1.2.7 Análise estatística.....	28
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
1.4 CONCLUSÃO .....	37
1.5 REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2 .....	42
ESTRUTURA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>Euschistus heros</i> (Fabricius, 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS NO BRASIL .....	42

RESUMO.....	43
ABSTRACT .....	44
2.1 INTRODUÇÃO .....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.2.1 Desenvolvimento e caracterização de locos microssatélites .....	46
2.2.2 Estudo da estrutura e diversidade de populações de <i>E. heros</i> .....	47
2.2.2.1 Amostragem .....	47
2.2.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	48
2.2.2.3 Análise de dados.....	51
2.3 RESULTADOS.....	52
2.3.1 Desenvolvimento e caracterização de locos SSR em <i>E. heros</i> .....	52
2.3.2 Estudo populacional de <i>E. heros</i> em culturas de soja do Brasil.....	53
2.3.2.1 Diversidade genética e gargalo genético.....	53
2.3.2.2 Estrutura genética e fluxo gênico .....	55
2.4 DISCUSSÃO .....	61
2.5 CONCLUSÃO .....	64
2.6 REFERÊNCIAS.....	65
REFERÊNCIA GERAL .....	70

## INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo da soja (*Glycine max* L.) está presente em todas as regiões do Brasil, sendo o centro-oeste com a maior área cultivada, de aproximadamente 14,4 milhões de hectares (CONAB, 2015). O levantamento realizado pela Conab (2015), referente a safra de 2014/15, indicou que a área de soja produzida no Brasil foi de 31,57 milhões de hectares, representando um aumento de 4,6% em relação à área da safra de 2013/14. Os estados que apresentaram as maiores áreas cultivadas foram Mato Grosso, Rio Grande do Sul e Paraná (CONAB, 2015).

O cultivo da soja em grande escala tornou-se um ambiente favorável para o desenvolvimento de diversas pragas e entre as mais agressivas estão os percevejos sugadores de grãos (PANIZZI *et al.*, 1979; CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). Estes insetos são conhecidos por ocasionarem danos diretos, através de puncturas realizadas durante a alimentação das vagens, sugando diretamente os grãos de soja, reduzindo a produção e a qualidade das sementes, e pela transmissão de patógenos (DEPIERI; PANIZZI, 2011; SILVA *et al.*, 2012).

Dentro do complexo de percevejos que atacam a soja, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae), é o mais abundante e causa preocupações principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil e recentemente na região norte da Argentina (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010; SALUSO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2014; SMANIOTTO; PANIZZI, 2015). No período de safra da soja podem ocorrer até três gerações desta espécie (MOURÃO; PANIZZI, 2000), deslocando-se durante a colheita para outros talhões ainda a serem colhidos. Nos estados produtores de algodão, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso esta movimentação ocorre para o algodão (BARROS; DEGRANDE, 2012). Nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul a quarta geração da praga ocorre em plantas hospedeiras como o feijão Guandú, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Leguminosae) (PANIZZI; OLIVEIRA, 1998) e posteriormente estes insetos entram em oligopausa, permanecendo escondidos na “palhada da cultura anterior” ou nas suas proximidades, até a safra seguinte (PANIZZI; NIVA, 1994).

Desde o início da década de 1990 tem-se observado falhas no controle de *E. heros*, constatando-se que as causas da ineficiência foram devidas à presença de indivíduos resistentes a endossulfam, metamidofós e monocrotofós, problema que persiste até o presente, no caso dos organofosforados (OFs) (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010), ampliando-se para outros grupos de inseticidas como as misturas de neonicotinoides e piretroides (HUSCH *et al.*, 2014). Por falta de alternativas, essas misturas e os produtos à base

de acefato são atualmente os inseticidas mais utilizados no controle de percevejos e o risco de seleção de indivíduos resistentes, torna-se cada vez mais frequente.

Diversas práticas favorecem a seleção de biótipos resistentes, entre elas: a não utilização dos níveis de ação por falta de monitoramento; uso de inseticidas com ação para percevejos nas aplicações iniciais para o controle de lagartas; não alternar inseticidas com modos de ação diferentes. Estas práticas têm como objetivo reduzir a população de uma praga mediante o aumento da mortalidade ou pela diminuição da fecundidade dos insetos. Porém, o uso indevido pode gerar possíveis diferenças na sobrevivência e ou fecundidade entre os indivíduos de uma população, após a utilização de algumas destas práticas de manejo, resultando na seleção de insetos resistentes (VIA, 1990).

O manejo da resistência tem como objetivo retardar ou reverter o processo de evolução da resistência das pragas, minimizando os danos econômicos em resposta as falhas no controle (OMER *et al.*, 1993; FITT *et al.*, 2006). Entre as principais ferramentas para o sucesso dos programas de manejo da resistência, está o monitoramento, que por sua vez, tem como finalidade evitar o processo evolutivo da resistência (BUSH *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 2009).

Entre as ferramentas para auxiliar a detecção de possíveis populações resistentes, estão as avaliações toxicológicas com o uso das concentrações letais, as quais servem para determinação de uma linha básica de suscetibilidade (ROUSH; MILLER, 1986); as avaliações bioquímicas com o uso de enzimas específicas associadas com os níveis de resistência estão entre as técnicas que ajudam a distinguir possíveis casos de resistência em uma praga de interesse. Entre as enzimas mais comuns envolvidas nos processos de detoxificação estão as esterases, oxidases, transferases e outras que, em consequência da presença de xenobióticos no organismo do inseto, aumentam sua eficiência ou sua quantidade nas populações resistentes, em relação a população suscetível para comparação (HEMINGWAY, 2000; ALIZADEH *et al.*, 2010).

Devido à grande importância de *E. heros* na cultura da soja, a detecção e caracterização de diferenças genéticas entre populações dessa praga é uma ferramenta importante para aprimorar as práticas de manejo e controle desta espécie. Entre as ferramentas moleculares mais utilizadas na análise de estrutura e diversidade de populações estão os marcadores microsatélites (SSRs), devido a sua elevada mutabilidade comparada com outros marcadores, são capazes de discriminar diferenças significativas entre populações e genótipos, além de detectar recentes alterações na história evolutiva das espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Diversos estudos têm utilizado com sucesso estes marcadores na análise de espécies pragas (DOMINGUES *et al.*, 2012; KIRK *et al.*, 2013; PAVINATO *et al.*, 2012). Porém, ainda pouco

se conhece sobre a estrutura e diversidade genética de *E. heros*, visto que, existem poucos trabalhos a respeito da diversidade de pentatomídeos pragas, entre eles, análise de RAPD de *E. heros*, *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), *Tibraca limbativentris* Stål, 1860 (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2004; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2005; KAVAR *et al.*, 2006; RAMPELOTTI *et al.*, 2008) e análise do genoma mitocondrial de *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (GARIEPY *et al.*, 2014).

Portanto este estudo teve como objetivos: realizar análises toxicológicas e bioquímicas de populações de *E. heros* coletadas nos estados de São Paulo e Paraná, aos ingredientes ativos, acefato, lambda-cialotrina, tiametoxam e a mistura de lambda-cialotrina+tiametoxam, em comparação com a população suscetível de referência para um melhor entendimento da resistência de *E. heros* aos principais inseticidas utilizados para o seu controle; realizar a análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *E. heros* de diferentes regiões brasileiras por meio de marcadores microssatélites para estimar parâmetros de estrutura populacional (fluxo gênico, variabilidade entre e dentro de populações geográficas).



## REFERÊNCIAS

- ALIZADEH M. *et al.* Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanism in two populations of *Eurygaster integriceps* puton (Heteroptera: Scutelleridae). **Munis Entomology & Zoology Journal**, v. 5, n. 2, p. 734 – 744, 2010.
- BARROS, R.; DEGRANDE, P.E. Desempenho do algodão-Bt como tática de controle de pragas em condições de campo. **Científica**, v. 40, p. 117-137, 2012.
- BUSH, M.R. *et al.* Azinphosmethyl resistance in the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae): reversion, diagnostic concentrations, associated esterases, and glutathione transferases. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 213-225, 1993.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**, oitavo levantamento, safra 2014/2015, v. 2, n. 8, 2015. 122p.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZU, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.
- DEPIERI, R. A.; PANIZZU, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n.2, p. 197-203, 2011.
- DOMINGUES, F.A. *et al.* Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 2136-2146, 2012.
- FITT, G. P. *et al.* Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. IN: HILBECK, A. ANDOW, D.A e FONTES, E.M.G. (Eds.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006, p. 300-345.
- GARIEPY, T. D., *et al.* Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. *Journal of Pest Science*, v. 87, p. 17–28, 2014.
- HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.1009–1015, 2000.
- HUSCH, P. E. *et al.* Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Euschistus heros* a Tiametoxam+Lambda-Cialotrina e Acefato. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 34., 2014, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, p. 78-80, 2014.
- KAVAR, T. *et al.* Genetic differentiation of geographically separated populations of the Southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, p. 117–128, 2006.

KIRK, H. *et al.* Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **BMC Ecology**, v.13, n. 12, 2013.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no Norte do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 205-218, 2000.

OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

OMER, A.D. *et al.* Sweetpotato whitefly resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation is related to insecticides use. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 67, p. 173-182, 1993.

PANIZZI, A. R. *et al.* Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood 1837) no rendimento e qualidade da soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA SOJA, 1, 1978, Londrina, 1979, **Anais...**, Londrina: EMBRAPA-CNPSO, v. 2, p. 59-78.

PANIZZI, A.R.; NIVA, C.C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 509-511, 1994.

PANIZZI, A. R.; OLIVEIRA, E. D. M. Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (Pigeonpea) and soybean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 169–175, 1998.

PAVINATO, V. A. *et al.* Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and molecular research**, v. 12, n. 1, p. 370-380, 2012.

RAMPELOTTI, F. T. Diversidade Genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, Usando Marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 20-29, 2008.

ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**, v.79, p.293-298, 1986.

SALUSO, A. *et al.* An invasive pentatomid pest in Argentina: neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 6, p. 704-705, 2011.

SILVA, F. A. C. *et al.* Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa mediotubunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p.386-390, 2012.

SILVA, L. D. *et al.* Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) no Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 116-125, 2009.

SILVA, V. P. da. *et al.* Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.49, n.11, p.844-852, 2014.

SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 7-17, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, n. 2 p.317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 179-187, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Journal of Insect Science**, v. 5, n. 23, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n.7, p.767-769, 2010.

VIA, S. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 421-426, 1990.

## **CAPÍTULO 1**

### **ANÁLISES BIOQUÍMICAS, DE SUSCETIBILIDADE E DE DOSE-RESPOSTA A INSETICIDAS EM POPULAÇÕES DE *Euschistus heros* (F., 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

## RESUMO

*Euschistus heros* (Fabricius, 1794) está entre as principais pragas da cultura da soja, com distribuição abundante desde o norte do Paraná até o Brasil Central. Isso levou esse inseto praga a ser um dos principais alvos nas aplicações de inseticidas durante o período de safra. Portanto, este trabalho teve como objetivos: avaliar a suscetibilidade de populações de *E. heros* coletadas nos estados de São Paulo, Paraná e Goiás através de aplicação tópica de tiametoxam (Actara® 250 WG) mais lambda-cialotrina (Engeo Pleno®) e acefato (Cefanol®); determinar a atividade enzimática e a análise de dose-resposta de oito populações de *E. heros* (Arapoti-PR, Campo Mourão-PR, Cândido Mota-SP 1 e 2, Palmital-SP, Pedrinhas Paulista-SP, Rolândia-PR e uma população selecionada pela aplicação da mistura de tiametoxam mais lambda-cialotrina durante 15 gerações) aos princípios ativos acefato, tiametoxam, lambda-cialotrina (Karate Zeon® 50 CS) e à mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina. Em todos os bioensaios foi utilizada uma população suscetível de referência. No experimento relativo ao primeiro objetivo, diferenças significativas de suscetibilidade foram detectadas para ambos os produtos testados. Nas análises com a mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina [concentração diagnóstica de 0,0846 e 0,0636 µg ingrediente ativo (i.a.) por percevejo adulto], as populações com mortalidade inferior a 44,4% (Arapoti-PR, Londrina-PR, Iguaçu-PR, Sertaneja-PR, Pedrinhas Paulista-SP, Palmital-SP e Santa Helena de Goiás-GO) diferiram significativamente da população de referência. A elevada sobrevivência sugere redução da suscetibilidade das populações de *E. heros* à mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina de 2013 a 2015. Em relação ao acefato, com o uso da concentração diagnóstica de 7,1 µg de i.a.adulto<sup>-1</sup>, todas as populações com mortalidade ≤ 79% (Bela Vista do Paraíso-PR, Iguaçu-PR, Santo Antônio da Platina-PR, Sertaneja-PR, Cândido Mota-SP, Iepê-SP, Nantes-SP, Palmital-SP e Pedrinhas Paulista-SP) diferiram significativamente da população de referência. Os resultados referentes ao segundo objetivo indicaram alta atividade de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase e glutathione-S-transferase para a população de Cândido Mota-SP. Esta mesma população apresentou resistência ao acefato, com taxa de 11,3 vezes, na avaliação de dose-resposta. Em contrapartida, a população de Pedrinhas Paulista-SP apresentou redução da suscetibilidade para lambda-cialotrina, com resistência de 6,0 vezes, e a maior atividade da 7-etoxicumarina-O-desetilase.

Palavras-chave: Percevejo marrom. Suscetibilidade. Acefato. Tiametoxam. Lambda-cialotrina. AChE. ECOD. Gst.  $\alpha$ -esterase.  $\beta$ -esterase.

## ABSTRACT

*Euschistus heros* (Fabricius, 1794) is among the major soybean pests, with abundant distribution from the north of Paraná to Central Brazil. This led this insect pest to become one of the main targets of insecticide applications during the growing season. Therefore, this study aimed to: assess the susceptibility of *E. heros* populations collected in the states of São Paulo, Paraná, and Goiás through topical application of thiamethoxam (Actara® 250 WG) plus lambda-cyhalothrin (Engeo Pleno®), and acephate (Cefanol®); determine enzyme activity and analyze the dose-response of eight populations of *E. heros* (Arapoti-PR, Campo Mourão-PR, Cândido Mota-SP 1 e 2, Palmital-SP, Pedrinhas Paulista-SP, Rolândia-PR, and one population selected by applying the mixture of thiamethoxam plus lambda-cyhalothrin to 15 generations) to the active principles acephate, thiamethoxam, lambda-cyhalothrin (Karate Zeon® 50 CS), and the mixture of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin. In all the bioassays a reference susceptible population was used. In the trial regarding the first objective, significant susceptibility differences were detected for both products tested. In the analyzes of the mixture of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin [diagnostic concentration of 0.0846 and 0.0636 µg active ingredient (a.i.) per adult stink bug], the populations exhibiting mortality rate inferior to 44.4% (Arapoti-PR, Londrina-PR, Iguaçu-PR, Sertaneja-PR, Pedrinhas Paulista-SP, Palmital-SP, and Santa Helena de Goiás-GO) significantly differed from the reference population. The high survival rate suggests a decrease in susceptibility of *E. heros* populations to the mixture of thiamethoxam and lambda-cyhalothrin from 2013 to 2015. In relation to acephate, using the diagnostic concentration of 7.1 µg a.i.adult<sup>-1</sup>, all the populations with mortality rate ≤ 79% (Bela Vista do Paraíso-PR, Iguaçu-PR, Santo Antônio da Platina-PR, Sertaneja-PR, Cândido Mota-SP, Iepê-SP, Nantes-SP, Palmital-SP, and Pedrinhas Paulista-SP) significantly differed from the reference population. The results regarding the second objective indicated high activity of  $\alpha$  and  $\beta$ -esterase and glutathione-S-transferase in the population from Cândido Mota-SP. The same population exhibited 11.3-fold resistance to acephate in the dose-response assessment. Contrastively, the population from Pedrinhas Paulista-SP exhibited a decrease in susceptibility for lambda-cyhalothrin, with 6.0-fold resistance, and the highest activity of *O*-dealkylase 7-etoxicumarina.

Keywords: Brown stink bug. Susceptibility. Acephate. Thiametoxam. Lambda-cyhalothrin. AChE. ECOD. Gst.  $\alpha$ -esterase.  $\beta$ -esterase.

## 1.1 INTRODUÇÃO

A dinâmica populacional de pragas da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] no Brasil ao longo dos anos, tem se modificado. No início dos anos 1970, as pragas chaves e secundárias eram inferiores a 10 espécies (CORSEUIL *et al.*, 1974), atualmente são mais de 40 (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2012). Entre elas, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Heteroptera: Pentatomidae), conhecido popularmente como o percevejo-marrom, está entre as principais pragas que atacam a cultura da soja no Brasil (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2014). A abundância desta praga dentro do complexo dos sugadores de grãos ultrapassou *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), ou percevejo-verde, (Heteroptera: Pentatomidae).

*Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) é conhecido por ocasionar danos diretos em vagens e grãos de soja, através de puncturas realizadas durante a alimentação servindo também como porta de entrada a patógenos (PANIZZI *et al.*, 1979). Além disso, podem contribuir para a redução do teor de óleo e elevação da taxa de proteínas e ácidos graxos livres nas sementes e favorecer o processo de retenção foliar, comumente conhecida por “soja louca” (HUSCH *et al.*, 2014a; PANIZZI *et al.*, 1979; SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 1995).

No período da safra de soja podem ocorrer até três gerações de *E. heros* (MOURÃO; PANIZZI, 2000). Esta praga, durante a colheita de soja, tem como habito se deslocar de talhões mais velhos para outros mais novos, na região Sul do Brasil, entretanto, no Mato Grosso do Sul e Mato Grosso esta movimentação ocorre das áreas de soja para as de algodão (BARROS; DEGRANDE, 2012).

No Paraná e Rio Grande do Sul a quarta geração da praga se desenvolve em plantas hospedeiras como o feijão guandú, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Leguminosae) (PANIZZI; OLIVEIRA, 1998) e posteriormente estes insetos entram em oligopausa, permanecendo sob a palhada da cultura anterior ou nas suas proximidades, até a safra seguinte (PANIZZI; NIVA, 1994).

Devido à ampla distribuição e abundância desta praga na cultura da soja, ao longo dos anos, práticas visando a economia nas pulverizações de inseticidas, aliado ao uso frequente de produtos de amplo espectro de ação, sobretudo na fase inicial do desenvolvimento da soja e o não uso das amostragens de pragas com o método do pano, tem levado a um grande desequilíbrio nas lavouras de soja acarretando sérios problemas como, por exemplo, a eliminação do complexo de inimigos naturais, levando a um maior custo de produção e poluição ambiental (CORRÊA-FERREIRA *et al.*, 2010). Fatos estes que contribuem para o aumento

populacional de *E. heros* que nos últimos anos teve um aumento no número de aplicações para o seu controle (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010).

Os primeiros registros de falhas no controle desta praga foram no início da década de 1990, com os produtos endosulfam, metamidofós e monocrotofós, problema que persiste até o presente, no caso dos organofosforados (OFs) (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010), ampliando-se para outros grupos de inseticidas como as misturas de neonicotinoides e piretroides (HUSCH *et al.*, 2014b). Atualmente, poucos são os produtos registrados no Brasil para o controle de percevejos. Em 2004, foram introduzidas as primeiras misturas de neonicotinoides (imidacloprido) e piretroides (beta-ciflutrina), e no ano seguinte, uma nova mistura de tiametoxam mais lambda-cialotrina foi recomendada para esta finalidade (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010). Por falta de alternativas, essas misturas e acefato, são os inseticidas mais usados no controle de percevejos, aumentando o risco de seleção de populações resistentes, cada vez mais frequentes.

Os mecanismos de resistência de insetos a inseticidas mais conhecidos e estudados, são: 1) resistência metabólica, ocorre quando organismo do inseto reage com um aumento na produção de enzimas metabólicas (ex: esterases, glutathione-transferases, monooxigenases P450 dependentes), que ocasionam a detoxificação e degradação dos inseticidas, ou pela eliminação rápida do organismo; 2) redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto, associada a modificações na sua composição; 3) modificação nos sítios alvos dos inseticidas, como alterações estruturais no gene (mutações) (FEYEREISEN, 1995; HEMINGWAY, 2000; FRENCH-CONSTANT *et al.*, 2004; BECKEL *et al.*, 2006; PUINEAN *et al.*, 2010).

Entre as enzimas mais comuns envolvidas nos processos de detoxificação estão as esterases, oxidases, transferases e outras que, em consequência da presença de xenobióticos no organismo do inseto, aumentam, por seleção, sua eficiência ou sua quantidade nas populações resistentes, em relação à outra população (HEMINGWAY, 2000; ALIZADEH *et al.*, 2010). As esterases estão diretamente ligadas no processo de detoxificação à organofosforados em *E. heros* (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2009) e *Eurygaster intergriceps* Putton, 1881 (Hemiptera: Scutelleridae) (ALIZADEH *et al.*, 2010); os organofosfatos também estão associados com o aumento das atividades metabólicas das esterases e glutathione-s-transferases (GST), como observado para *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois, 1818) (Hemiptera: Miridae) (ZHU *et al.*, 2011), e da acetilcolinesterase em Dípteros, como *Anopheles albimanus* (Weidmann, 1821) (Diptera: Culicidae), *Culex vishnui* Theobald, 1901, *C. pipiens* Linnaeus, 1758 (ALOUT *et al.*, 2007) e alguns lepidópteros (GUNNING; MOORES, 2001); e o complexo P450 monooxigenase associado com a resistência a neonicotinoides, com *Nilaparvata lugens* (Stål,



1854) (Hemiptera: Delphacidae) (BASS *et al.*, 2011), *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) (MARKUSSEN; KRISTENSEN, 2010), *Bemisia tabaci* (Gennadius 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) (JONES *et al.*, 2011); o efeito dos piretroides no organismo dos insetos pode ser observado pela avaliação na atividade enzimática das esterases, GST e monooxigenases, como observado para *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Hemiptera: Cimicidae) (ADELMAN *et al.*, 2011), *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) (SILVA, *et al.*, 2015) e principalmente através da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, que está diretamente ligada com o processo de detoxificação deste ingrediente ativo (LI *et al.*, 2006).

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade de diferentes populações de *E. heros* ao acefato e à mistura de tiametoxam mais lambda-cialotrina e determinar o perfil bioquímico de enzimas de metabolização em oito populações de *E. heros* e análises de dose-resposta aos princípios ativos, organofosforado, piretroide e neonicotinoide. Pois até o momento somente estudos de dose-resposta foram utilizados com *E. heros* para detectar casos de resistência. Os experimentos foram conduzidos com as três classes de produtos químicos mais utilizados para o controle de percevejos na cultura da soja.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Populações de *E. heros*

As populações de *E. heros* foram coletadas em campo, de 22 pontos de amostragem em regiões produtoras de soja e transportadas no mesmo dia da coleta para o Laboratório de Criação de Percevejos do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja, Londrina, PR), e mantidos em quarentena até a realização dos bioensaios. As coordenadas geográficas referentes a cada local de coleta foram gravadas com o uso do GPS utilizando o sistema Datum WGS84 (Garmin Etrex, Chicago, IL, USA) (TABELA 1.1). A população suscetível de referência é proveniente da criação de percevejos da Embrapa Soja.

TABELA 1.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE *Euschistus heros*. (CONTINUA)

LOCAIS	Nº TOTAL INDV. COL. <sup>1</sup>	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	DATA DE COLETA
População Suscetível de Referência	1000	S 23°12'15,2" W 51°10'55,6"	12/2011
Santo Antônio da Platina, PR – Gleba S	30	S 23°15'51,2" W 50°07'38,4" S 23°16'19,8" W 50°06'51,3"	12/2012

TABELA 1.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE *Euschistus heros*. (CONCLUSÃO)

LOCAIS	Nº TOTAL INDV. COL. <sup>1</sup>	COORDENADAS GEOGRÁFICAS	DATA DE COLETA
Santo Antônio da Platina, PR – Gleba F	60	S 23°14'25,6" W 49°59'48,5" S 23°14'26,4" W 49°59'21,0"	12/2012
Arapoti, PR – Gleba ATE	60	S 24°10'50,3" W 49°55'56,6"	12/2012
Londrina, Distrito da Warta, PR – 1	840	S 23°12'15,7" W 51°10'56,8" S 23°11'29,6" W 51°10'31,5"	08/03/2013
Cambé, PR	840	S 23°08'29,9" W 51°16'01,0"	14/03/2013
Bela Vista do Paraíso, PR	1800	S 22°54'12,8" W 51°14'44,9"	08/04/2013
Sertaneja, PR	990	S 22°56'45,8" W 50°56'30,9"	16/04/2013
Cândido Mota, SP	1000	S 22°43'07,8" W 50°18'56,3"	24/04/2013
Palmital, SP	1000	S 22°42'28,9" W 50°14'58,5"	24/04/2013
Pedrinhas Paulista, PR – 1	640	S 22°49'09,1" W 50°45'50,2"	30/04/2013
Iguaraçu, PR	720	S 23°13'30,6" W 51°48'18,8"	07/05/2013
Iepê, SP	640	S 22°37'07,8" W 51°09'18,8"	15/05/2013
Nantes, SP	640	S 22°36'37,1" W 51°15'28,6"	15/05/2013
Arapoti, PR – Gleba Frente	560	S 24°11'55,8" W 49°55'12,4"	21/05/2013
Arapoti, PR – Gleba Perdiz	560	S 24°12'14,4" W 49°55'34,9"	21/05/2013
Arapoti, PR – Gleba Capão	560	S 24°10'11,0" W 49°56'17,5"	21/05/2013
Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 1	560	S 23°15'42,6" W 50°06'12,9"	04/06/2013
Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 2	560	S 23°16'41,6" W 50°07'03,2"	04/06/2013
Londrina, Distrito da Warta, PR – 2	400	S 23°11'09,0" W 51°10'23,0"	14/08/2013
Santa Helena de Goiás, GO	70	S 17°50'07,3" W 50°34'51,4"	10/03/2014
Londrina, PR	120	S 23°17'53,0" W 51°06'04,0"	13/03/2014
Pedrinhas Paulista, PR – 2	1500	S 22°48'11,4" W 50°46'12,6"	24/03/2014

<sup>1</sup> Número total de indivíduos coletados.

## 1.2.2 Bioensaios de suscetibilidade de *E. heros* à inseticidas

Para a realização dos bioensaios, foram utilizadas formulações comerciais da mistura de tiametoxam (141 g.l<sup>-1</sup>) + lambda-cialotrina (106 g.l<sup>-1</sup>) (Engeo Pleno®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.), e o acefato na concentração de 750 g/kg (Cefanol®, Sipcam UPL Brasil S.A.) e água.

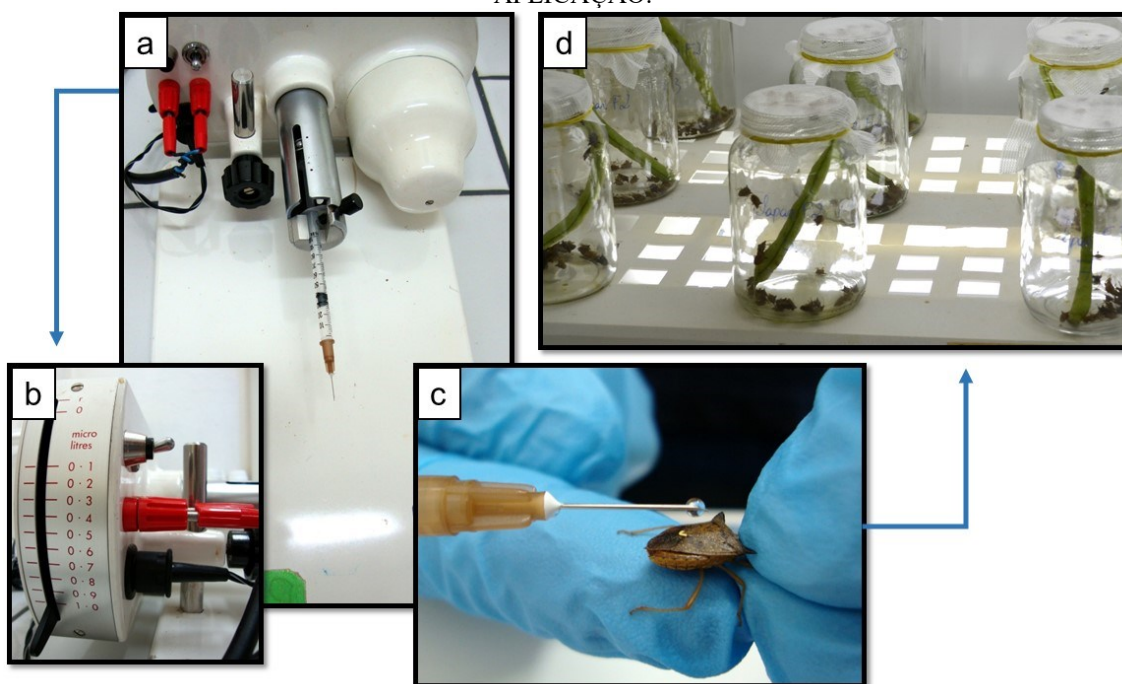
Como parâmetro de avaliação, para cada produto fez-se o uso de uma concentração igual à utilizada por Sosa-Gómez *et al.* (2011). Cada percevejo adulto foi tratado com 2 µl de suspensão (0,0846 µg de i.a. de tiametoxam + 0,0636 µg de i.a. de lambda-cialotrina) ou 7,1 µg de i.a. de acefato, e testemunhas tratadas somente com 2 µl de água.

Os bioensaios foram realizados com o auxílio do microaplicador (Burkard Manufacturing Co. Ltd. Rickmansworth, Hertfordshire, WD31PJ, England) (FIGURA 1.1). Os percevejos foram mantidos em laboratório seguindo a metodologia de Sosa-Gómez e Silva (2010). A mortalidade foi avaliada após 24, 48 e 72 horas. Os percevejos foram considerados morto quando não apresentavam movimento ao serem tocados com pincel.

### 1.2.3 Análise de suscetibilidade

A mortalidade dos percevejos submetidos à aplicação tópica de tiametoxam+lambda-cialotrina e acefato foi avaliada após 48 horas, os dados foram corrigidos utilizando a fórmula de Henderson e Tilton (1955). Atendidos os pressupostos da Anova como: a normalidade (SHAPIRO; WILK, 1965), independência dos erros (Parente 1984), a aditividade do modelo (TUKEY, 1949) e a homogeneidade de variâncias dos tratamentos (BURR; FOSTER, 1972), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). O pacote estatístico utilizado foi o Statistical Analysis System - SAS (SAS, 2009).

FIGURA 1.1 – (a) MICROAPLICADOR (Burkard Manufacturing Co. Ltd. Rickmansworth, Hertfordshire, WD31PJ, England); (b) DOSADOR; (c) MICROAPLICAÇÃO TÓPICA; (d) FRASCOS ESTERILIZADOS E VAGENS DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) COMO ALIMENTO APÓS APLICAÇÃO.



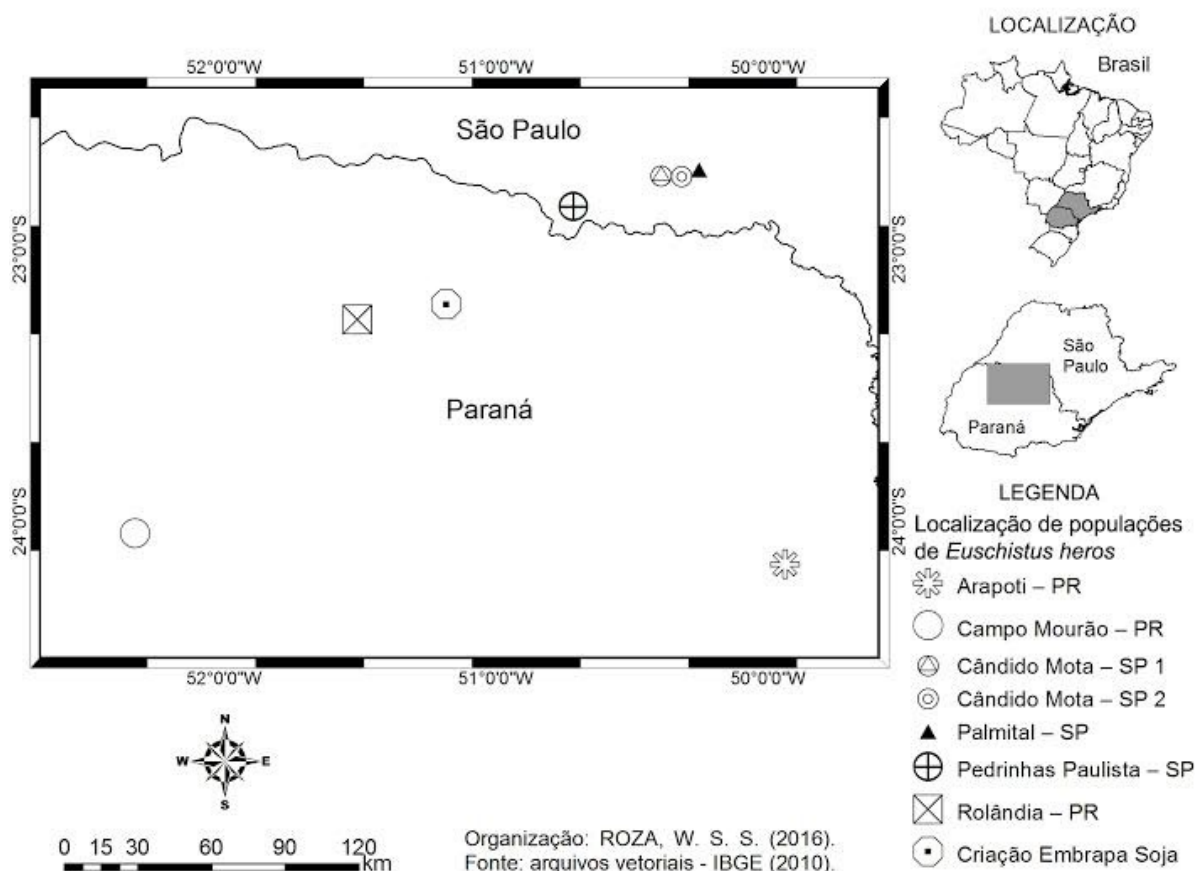
FONTE: O autor (2012).

### 1.2.4 Populações de *E. heros* utilizados nos bioensaios e análises enzimáticas

As populações foram coletadas em campo (FIGURA 1.2), de sete localidades (TABELA 1.2), que tiveram baixa mortalidade nas avaliações de suscetibilidade realizadas nas últimas três safras (2012/13, 2013/14 e 2014/2015), com a mistura de tiametoxam, 141g.l<sup>-1</sup> + lambda-cialotrina, 106 g.l<sup>-1</sup> (Engeo Pleno®, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda). Além destas, mais duas populações da criação da Embrapa Soja, uma delas suscetível de referência para

servir de comparação às demais e outra foi selecionada aplicando a mistura de tiametoxam + lambda cialotrina durante 15 gerações.

FIGURA 1.2 – LOCALIDADES DE COLETA DE *E. heros*.



#### 1.2.5 Análises de dose-resposta das populações de *E. heros*

As concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub>) foram determinadas para cada população de *E. heros* (TABELA 1.2), utilizando sete concentrações para os seguintes ingredientes ativos (i.a.), acefato (Acefato Nortox®, Nortox S.A), tiametoxam+lambda-cialotrina (Engeo Pleno®), lambda-cialotrina (Karate Zeon® 50 CS); tiametoxam (Actara® 250 WG), estes três últimos produtos da empresa Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. A aplicação dos produtos foi realizada com o auxílio do microaplicador (Burkard Manufacturing Co. Ltd. Rickmansworth, Hertfordshire, WD31PJ, England), dosado para 2 µl, que foram aplicados na região pronotal de cada indivíduo adulto. Após a aplicação os insetos foram mantidos em laboratório seguindo a metodologia de Sosa-Gómez e Silva (2010). A mortalidade foi avaliada após 24, 48 e 72 horas.

TABELA 1.2 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS OITO POPULAÇÕES DE *E. heros* UTILIZADAS NOS BIOENSAIOS E ANÁLISES ENZIMÁTICAS.

POPULAÇÕES	TESTES		COORDENADAS GEOGRÁFICAS	DATA DE COLETA
	BIOENSAIOS (Nº DE INDIV.) <sup>1</sup>	ANÁLISE ENZ. (Nº REP.) <sup>2</sup>		
Pop. Suscetível de Referência	480	10	S 23°12'15,2" W 51°10'55,6"	Dez/2011
População Seleccionada <sup>3</sup>	400	10	S 23°12'15,2" W 51°10'55,6"	Dez/2011
Arapoti – PR	-	10	S 24°09'29,2" W 49°56'14,3"	19/03/2015
	750	-	S 24°11'55,9" W 49°55'07,5"	20/08/2015
Campo Mourão – PR	-	10	S 24°02'40,9" W 52°19'27,8"	12/02/2015
	720	-	S 23°59'32,8" W 52°20'37,1"	13/08/2015
Cândido Mota – SP 1	-	10	S 22°43'55,7" W 50°23'31,5"	12/03/2015
	880	-	S 22°43'07,8" W 50°18'58,2"	04/08/2015
Cândido Mota – SP 2	120	10	S 22°44'02,8" W 50°19'02,5"	08/10/2015
Palmital – SP	-	10	S 22°42'31,0" W 50°15'00,7"	27/02/2015
	840	-	S 22°42'28,7" W 50°14'58,3"	02/09/2015
Pedrinhas Paulista – SP	-	10	S 22°50'43,0" W 50°42'49,3"	05/03/2015
	640	-	S 22°49'36,8" W 50°44'45,3"	28/07/2015
Rolândia – PR	-	10	S 23°15'34,4" W 51°30'25,4"	02/03/2015
	1760	-	S 23°15'34,4" W 51°30'25,3"	30/07/2015

<sup>1</sup> Número total de indivíduos utilizados em cada bioensaio.

<sup>2</sup> Número de repetições em cada análise enzimática.

<sup>3</sup> A seleção foi realizada aplicando topicamente doses utilizadas para causar mortalidades próximas a 90%.

## 1.2.6 Análises bioquímicas das populações de *E. heros*

### 1.2.6.1 Amostras

Os insetos foram coletados em campo, separados cerca de 50 indivíduos de cada população para análise bioquímica. Estes percevejos foram mortos e conservados em freezer a - 80 °C. Em cada uma das análises foram utilizadas 10 repetições por população.

### 1.2.6.2 Acetilcolinesterase

A análise de acetilcolinesterase foi realizada utilizando pools com três cabeças (10 réplicas de cada pool) de *E. heros*, homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,8; 1:10 p/v), centrifugados a 13.000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da AChE (nmol DTNB. min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>) pelo método de Ellman *et al.* (1961) e adaptado para microplaca por Bocquene e Galgani (1998). As amostras

foram diluídas em tampão fosfato de potássio (1:5) e pipetadas em quadriplicatas de 50 µl em microplacas de 96 poços (no branco foi pipetado 50 µl de tampão fosfato de potássio), seguido de 200 µl de DTNB (5,5-ditio-bis-2nitro-benzoato), 0,5 mM e 50 µl do substrato iodeto de acetiltiocolina (ACTI) à 7,32 mM imediatamente antes da leitura. A cinética enzimática foi determinada espectrofotometria a 415 nm, realizando três leituras, em um intervalo 0, três e seis min (Victor 3, Perkin Elmer, USA).

#### 1.2.6.3 Citocromo P450 Monooxygenase

A determinação da atividade da 7-etoxicumarina-O-desetilase (ECOD) seguiu o protocolo descrito por Bouvier *et al.*, (1998) adaptado por Picollo *et al.*, (2005). Para esta análise foram utilizados 10 percevejos (10 réplicas) por população, dos quais foram retiradas as vísceras. Essas foram pesadas e separadas individualmente em poços de microplacas. Em cada amostra foi adicionado 100 µl de tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,2), já acrescido do substrato 7-etoxicumarina (7-EC) a 4 mM. As microplacas foram centrifugadas a 2000 g a 4°C por 60 segundos para precipitar as vísceras e em seguida ficaram incubadas por quatro horas a 30°C. Finalizado o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de solução tampão de glicina ( $10^{-4}$  M) e as placas foram novamente centrifugadas (2000 g a 4°C) para precipitação das vísceras nos poços. O produto da reação, hidroxycumarina foi quantificado em espectrofluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, USA), com filtro de excitação de 405 nm e filtro de emissão de 460 nm. A atividade específica de ECOD foi calculada a partir da intensidade de fluorescência do produto final (hidroxycumarina) produzido durante o tempo da reação, e das curvas padrão de hidroxycumarina, sendo expressas em nmoles de hidroxycumarina min<sup>-1</sup> mg de víscera<sup>-1</sup>. As curvas padrão foram construídas pela determinação da intensidade de fluorescência de soluções de hidroxycumarina.

#### 1.2.6.4 Esterases alfa e beta ( $\alpha$ e $\beta$ -esterase)

As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), pool com quatro vísceras diluídas na proporção 1:25 (10 réplicas). A atividade das esterases foi quantificada pelo consumo de  $\alpha$  e  $\beta$ -naftil como substrato. O experimento foi montado em microplacas, seguindo o método proposto por Brasil (2006). Para  $\alpha$ -esterase, foi adicionado 10 µL de amostra diluída (1:20) em cada poço, acrescentado de 200 µL do reagente  $\alpha$ -naftil acetato (0,3 mM) em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7,2), como controle positivo foi utilizado

10 µl de solução de  $\alpha$ -naftol a  $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  ( $\sim 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e para o branco somente poços com água. A reação foi mantida em temperatura ambiente durante 15 min, em seguida foram acrescentados 50 µL de Fast Blue ( $0,3 \%$  Fast Blue B em  $3,5 \%$  de SDS - dodecil sulfato de sódio) e mantidos sob mesma temperatura por mais cinco min, realizando a leitura a em “*end point*” a 544 nm (Victor 3, Perkin Elmer, USA). A atividade da  $\beta$ -Est seguiu as mesmas concentrações utilizadas para  $\alpha$ , entretanto como base da reação foi usado o  $\beta$ -naftil acetato ( $0,3 \text{ mM}$ ) em tampão fosfato de sódio ( $20 \text{ mM}$ , pH 7,2), e o controle positivo feito com  $\beta$ -naftol a  $0,5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  ( $\sim 3,5 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### 1.2.6.5 Glutathione-S-transferase

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada pelo método de Keen *et al.*, (1976) em espectrofotômetro (Libra S32 Biochrom, UK) a 340 nm (1 min). Para cada amostra um pool com cinco vísceras de *E. heros* (10 réplicas de cada pool), foram homogeneizados (tampão fosfato de potássio,  $0,1 \text{ M}$ , pH 7,0) e diluídos na proporção 1:5 e, pipetados (10 µl) em duas réplicas para cada repetição. As amostras foram preparadas com 970 µl de tampão fosfato de potássio, 10 µl da amostra diluída, 10 µl do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a  $100 \text{ mM}$  preparado em etanol 100% e 10 µl do reagente glutathione reduzida (GSH) a  $100 \text{ mM}$  preparado em tampão fosfato de potássio. A quantificação da atividade enzimática foi expressa em nmol de CDBN conjugado  $\text{min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ .

#### 1.2.6.6 Proteínas totais

Com exceção da ECOD as demais análises tiveram a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (1976), já para quantificação da atividade da ECOD foi realizada uma correção pelo valor da massa de cada amostra, ambas análises foram realizadas em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, USA).

#### 1.2.7 Análise estatística

Os dados de mortalidade referente aos bioensaios foram submetidos à análise de Probit através do programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 2003). A razão de resistência foi determinada através da divisão da  $CL_{50}$  das oito populações estudadas (Pop. Seleccionada, Arapoti-PR, Campo Mourão-PR, Cândido Mota-SP 1, Cândido Mota-SP 2, Palmital-SP,

Pedrinhas Paulista-SP e Rolândia-PR) em razão da CL<sub>50</sub> da população suscetível de referência (Criação Embrapa Soja, Londrina, PR).

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O monitoramento da suscetibilidade de *E. heros* para o ingrediente ativo acefato de algumas localidades das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, com o plantio de soja é uma prática realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Unidade Soja (Embrapa Soja, Londrina, PR) à 15 anos (desde 2000) e mais recentemente à mistura de tiametoxam+lambda-cialotrina (desde 2012) e algumas das populações de *E. heros* utilizadas neste experimento, tem sido monitoradas ao longo desses anos. No período de 2013 a 2015, foram detectadas diferenças significativas de suscetibilidade, para ambos os produtos. Nas análises com a mistura de tiametoxam+lambda-cialotrina as populações com mortalidades inferiores a 57,9 % diferiram significativamente da população suscetível de referência (TABELA 1.3), Londrina, Distrito da Warta, PR – 1 (42,9%), Pedrinhas Paulista, SP – 2 (42,5%), Arapoti, PR – Gleba Perdiz (39,5%), Iguaçu, PR (38,3%), Londrina, PR (24,5%), Sertaneja, PR (18,6%) e Santa Helena de Goiás, GO (16,7%).

TABELA 1.3 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO – EP) DE SUBPOPULAÇÕES DE *E. heros*, TRATADAS COM 0,15  $\mu$ g DE TIAMETOXAM (0,0846  $\mu$ g) + LAMBDA-CIALOTRINA (0,0636  $\mu$ g), POR ADULTO<sup>1</sup>. (CONTINUA)

LOCAIS	Nº DE INDIVÍDUOS <sup>2</sup>	MORTALIDADE (%) $\pm$ EP	
Santo Antonio da Platina, PR – Ponto 2	240	94,4 $\pm$ 2,3	a
Iepê, SP	280	92,1 $\pm$ 1,5	ab
Arapoti, PR – Gleba Frente	240	90,8 $\pm$ 2,4	ab
Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 1	240	89,2 $\pm$ 3,8	ab
Londrina, Distrito da Warta, PR – 2	360	86,3 $\pm$ 3,8	abc
População suscetível de referência	120	77,7 $\pm$ 5,9	abcd
Nantes, SP	280	75,7 $\pm$ 2,5	abcd
Cambé, PR	270	73,6 $\pm$ 3,9	abcd
Arapoti, PR – Gleba Capão	200	72,0 $\pm$ 5,0	abcd
Santo Antônio da Platina, PR – Gleba S	30	70,0 $\pm$ 11,5	abcd
Bela Vista do Paraíso, PR	760	69,0 $\pm$ 2,2	bcde
Candido Mota, SP	280	61,4 $\pm$ 5,1	cdef
Pedrinhas Paulista, SP – 1	240	57,9 $\pm$ 6,7	def
Santo Antônio da Platina, PR – Gleba F	40	44,4 $\pm$ 7,9	efg



TABELA 1.4 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO – EP) DE SUBPOPULAÇÕES DE *E. heros*, TRATADAS COM 0,15  $\mu$ g DE TIAMETOXAM (0,0846  $\mu$ g) + LAMBDA-CIALOTRINA (0,0636  $\mu$ g), POR ADULTO<sup>1</sup>. (CONCLUSÃO)

LOCAIS	Nº DE INDIVÍDUOS <sup>2</sup>	MORTALIDADE (%) $\pm$ EP	
Londrina, Distrito da Warta, PR – 1	300	42,9 $\pm$ 3,7	fgh
Pedrinhas Paulista, PR – 2	120	42,5 $\pm$ 8,5	fgh
Arapoti, PR – Gleba Perdiz	200	39,5 $\pm$ 6,5	fghi
Iguaraçu, PR	240	38,3 $\pm$ 6,7	fghi
Palmital, SP	240	27,5 $\pm$ 6,9	ghi
Arapoti, PR – Gleba ATE	60	25,0 $\pm$ 2,2	ghi
Londrina, PR	90	24,5 $\pm$ 4,1	ghi
Sertaneja, PR	210	18,6 $\pm$ 4,1	hi
Santa Helena de Goiás, GO	60	16,7 $\pm$ 6,8	i
CV		19,4	

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,0001$ ).

<sup>2</sup> O número de repetições para cada bioensaio variou entre 3 a 19.

Em relação ao ingrediente ativo acefato, todas as populações com mortalidades  $\leq 79\%$  diferiram significativamente da população suscetível (TABELA 1.4), com destaque Sertaneja, PR (34,3%), Cândido Mota, SP (33,1%), Nantes, SP (31,1) e Iguaraçu, PR (14,7%).

As análises de suscetibilidade indicaram a elevada sobrevivência de *E. heros* nos bioensaios com a mistura de tiametoxam+lambda-cialotrina, indicando uma redução da suscetibilidade através do tempo, uma vez que a mortalidade observada em 2011, em populações de São Paulo e Paraná foram superiores a 79,5% (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2011), entretanto, os resultados deste trabalho indicaram que dos 22 pontos amostrados, 17 deles tiveram mortalidade abaixo de 77,7%, valor obtido pela população suscetível de referência.

TABELA 1.5 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO – EP) DE POPULAÇÕES DE *E. heros*, TRATADAS COM 7,1  $\mu$ g DE ACEFATO, POR ADULTO<sup>1</sup>. (CONTINUAÇÃO)

LOCAIS	Nº DE INDIVÍDUOS <sup>2</sup>	MORTALIDADE (%) $\pm$ EP	
População suscetível de referência	120	99,1 $\pm$ 0,9	a
Londrina, Distrito da Warta, PR	360	99,1 $\pm$ 0,5	a
Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 1	200	79,0 $\pm$ 3,8	b
Bela Vista do Paraíso, PR	640	68,4 $\pm$ 2,5	bc
Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 2	200	59,0 $\pm$ 4,1	cd
Pedrinhas Paulista, PR – 1	240	47,5 $\pm$ 2,7	de
Palmital, SP	240	40,8 $\pm$ 4,2	ef
Sertaneja, PR	330	34,3 $\pm$ 3,0	ef
Cândido Mota, SP	160	33,1 $\pm$ 5,0	ef
Nantes, SP	280	31,1 $\pm$ 2,2	f

TABELA 1.6 – MORTALIDADE MÉDIA ( $\pm$  ERRO PADRÃO – EP) DE POPULAÇÕES DE *E. heros*, TRATADAS COM 7,1  $\mu$ g DE ACEFATO, POR ADULTO<sup>1</sup>. (CONTINUAÇÃO)

LOCAIS	Nº DE INDIVÍDUOS <sup>2</sup>	MORTALIDADE (%) $\pm$ EP	
Iepê, SP	240	28,6 $\pm$ 2,1	fg
Iguaraçu, PR	320	14,7 $\pm$ 1,3	g
CV		14,1	

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,0001$ ).

<sup>2</sup> O número de repetições para cada bioensaio variou entre 4 a 16.

Em relação ao ingrediente ativo acefato que é indicado para o controle de percevejos há mais tempo que as misturas de piretroides e neonicotinoides, os resultados obtidos por Sosa-Gómez e Silva (2010) indicaram a menor suscetibilidade em indivíduos provenientes de Alvorada do Sul, PR, mortalidade de 36,4%. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que das 11 populações coletadas, 10 delas tiveram diferença significativa de suscetibilidade em relação a população suscetível de referência e que destes, cinco pontos amostrados tiveram mortalidade inferior a 36%, que foi a menor taxa de mortalidade obtida por Sosa-Gómez e Silva (2010), com aplicação tópica de 1,2  $\mu$ g de i.a. acefato por percevejo, isto representa 5,9  $\mu$ g de i.a a manes que o utilizado neste trabalho.

As análises de dose-resposta demonstraram que as populações apresentaram maior taxa de resistência para o acefato, seguido de tiametoxam, a mistura de lambda-cialotrina+tiametoxam e lambda-cialotrina, respectivamente (TABELA 1.5). As populações de Cândido Mota-SP 1 e 2 foram as que apresentaram as maiores taxas de resistência para o organofosforado (11,3 vezes), seguido de Rolândia-PR (8,0 vezes) e Pedrinhas Paulista-SP (4,3 vezes). Avaliações de suscetibilidade realizadas na safra anterior 2012/2013 demonstraram que a população de Pedrinhas Paulista apresentou uma das menores taxas de mortalidade para o i.a. acefato (47,5%) (HUSCH *et al.*, 2014b). Esta região, especificamente, tem registro de problemas com organofosforados desde 2001 (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2009). Populações de Cândido Mota-SP e Palmital também obtiveram baixa mortalidade, 33,1% e 40,8%, respectivamente, nos ensaios realizados na safra de 2012/2013 (HUSCH *et al.*, 2014).

O controle de percevejos com organofosforados na cultura da soja é permitido e recomendado há mais tempo do que outros inseticidas como piretroides e neonicotinoides (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010), portanto a exposição a este ingrediente ativo é maior em relação a outros agrotóxicos. Fato este, que dificulta o manejo da resistência e devido à falta de alternativas. Produtos à base de acefato e essas misturas de neonicotinoides e piretroides são

atualmente os inseticidas mais utilizados para o controle de percevejos, aumentando o risco de seleção de populações resistentes.

As avaliações com a mistura do neonicotinoide mais piretroide, obtiveram menores taxas de resistência em comparação com a população suscetível de referência (TABELA 1.5). López *et al.*, (2012) verificaram que a toxicidade do produto comercial com mistura de i.a. em comparação com mistura do composto técnico (produto puro), para o percevejo marrom *E. servus* (Say, 1832), observaram que tais misturas variam do sinergismo ao antagonismo, provavelmente pela ausência de aditividade e/ou sinergismo entre os i.a. e inertes das formulações. Porém, nas avaliações de suscetibilidade para o produto comercial Engeo Pleno, populações de Arapoti apresentaram baixa mortalidade para o produto durante as safras de 2012/2013 (25,0 e 39,5%), seguido de Palmital-SP com 27,5%, Pedrinhas Paulista-SP com 42,5 e 57,9% e Cândido Mota-SP 1 com 61,4% (HUSCH *et al.*, 2014b). Visto que essas três últimas populações são de regiões próximas ( $\pm 60$  Km), mas não os mesmos locais, estes dados sugerem que o manejo adotado em cada ponto de coleta, provavelmente tenha influenciado no estudo.

As análises de CL<sub>50</sub> com o i.a. tiametoxam indicaram taxas de resistência para a população de Rolândia-PR (5,3 vezes), seguida de Cândido Mota-SP 1 (4,8 vezes) e Pedrinhas Paulista-SP (4,3 vezes), indicando que tais regiões provavelmente possuam problemas de resistência múltipla, uma vez que apresentaram problemas de resistência também a organofosforado.

TABELA 1.7 – BIOENSAIOS DE DOSE-RESPOSTA AO ACEFATO, LAMBDA-CIALOTRINA+THIAMETOXAM, LAMBDA-CIALOTRINA E THIAMETOXAM, EM POPULAÇÕES DE *E. heros* COM APLICAÇÕES TÓPICAS DE DOSES UTILIZADAS PARA CAUSAR MORTALIDADES PRÓXIMAS A 90%. (CONTINUAÇÃO)

<i>Acefato</i>						
POPULAÇÕES	N <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>2</sup>	INCLINAÇÃO $\pm$ EP <sup>3</sup>	X <sup>24</sup>	GL <sup>5</sup>	FR <sup>6</sup>
Pop. Susc. Ref. <sup>7</sup>	120	1,058 (0,689 - 1,811)	2,093 ( $\pm$ 0,365)	0,173	1	
Pop. Seleccionada <sup>8</sup>	120	-	-	-	-	-
Arapoti-PR	240	3,941 (0,981 - 9,917)	1,641 ( $\pm$ 0,248)	10,399 <sup>9</sup>	4	3.7
Cândido Mota-SP 1	160	11,967 (8,701 - 24,013)	2,553 ( $\pm$ 0,778)	0,001	1	11.3
Cândido Mota-SP 2	120	11,970 (6,058 - 17,581)	2,931 ( $\pm$ 0,978)	1,706	3	11,3
Pedrinhas Paulista-SP	160	4,589 (3,235 - 6,605)	2,350 ( $\pm$ 0,400)	1,827	2	4,3
Rolândia-PR	440	8,441 (3,959 - 16,448)	2,420 ( $\pm$ 0,296)	23,783*	5	8,0
Palmital-SP	120	2,400 (0,704 - 5,671)	1,213 ( $\pm$ 0,287)	0,232	1	2,3
Campo Mourão-PR	120	3,126 (0,798 - 6,999)	1,201 ( $\pm$ 0,398)	0,010	1	3,0
<i>Lambda cialotrina + thiametoxam</i>						
Pop. Susc. Ref.	120	0,246 (0,153 - 0,587)	2,881 ( $\pm$ 0,738)	0,441	2	
Pop. Seleccionada	80	0,173 (0,091 - 0,318)	3,116 ( $\pm$ 0,680)			

TABELA 1.5 – BIOENSAIOS DE DOSE-RESPOSTA AO ACEFATO, LAMBDA-CIALOTRINA+THIAMETOXAM, LAMBDA-CIALOTRINA E THIAMETOXAM, EM POPULAÇÕES DE *E. heros* COM APLICAÇÕES TÓPICAS DE DOSES UTILIZADAS PARA CAUSAR MORTALIDADES PRÓXIMAS A 90%. (CONCLUSÃO)

<i>Lambda cialotrina + thiametoxam</i>						
POPULAÇÕES	N <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>2</sup>	INCLINAÇÃO ± EP <sup>3</sup>	X <sup>24</sup>	GL <sup>5</sup>	FR <sup>6</sup>
Arapoti-PR	150	-	-	-	-	-
Cândido Mota-SP 1	160	0,189 (0,083 - 0,385)	2,034 (± 0,317)	7,922	4	
Pedrinhas Paulista-SP	160	0,200 (0,157 - 0,255)	3,473 (± 0,624)	0,683	2	
Rolândia-PR	440	0,339 (0,247 - 0,454)	2,600 (± 0,238)	8,823	5	1,4
Palmital-SP	240	0,188 (0,068 - 0,384)	1,253 (± 0,172)	11,496*	5	
Campo Mourão-PR	120	0,246 (0,201 - 0,298)	7,842 (± 1,990)	0,011	1	
<i>Lambda cialotrina</i>						
Pop. Susc. Ref.	120	0,193 (0,072 - 0,446)	1,249 (± 0,348)	0,194	1	
Pop. Seleccionada	80	0,238 (0,136 - 0,506)	1,548 (± 0,365)	4,914	4	1,2
Arapoti-PR	240	1,058 (0,436 - 2,555)	0,764 (± 0,190)	1,186	2	5,5
Cândido Mota-SP 1	280	0,336 (0,156 - 0,569)	1,123 (± 0,162)	6,026	5	1,7
Pedrinhas Paulista-SP	160	1,156 (0,487 - 3,559)	1,535 (± 0,234)	5,193	5	6,0
Rolândia-PR	440	0,422 (0,170 - 0,786)	0,653 (± 0,116)	5,018	5	2,2
Palmital-SP	240	0,252 (0,070 - 0,496)	1,373 (± 0,191)	11,788*	5	1,3
Campo Mourão-PR	240	0,520 (0,248 - 0,941)	1,031 (± 0,163)	5,913	5	2,7
<i>Thiametoxam</i>						
Pop. Susc. Ref.	120	0,370 (0,150 - 0,659)	1,541 (± 0,429)	1,619	2	
Pop. Seleccionada	120	0,510 (0,347 - 0,705)	3,316 (± 0,175)	2,106	3	1,4
Arapoti-PR	120	-	-	-	-	-
Cândido Mota-SP 1	280	1,769 (0,890 - 3,130)	1,368 (± 0,175)	9,202	5	4,8
Pedrinhas Paulista-SP	160	1,584 (0,823 - 3,110)	2,058 (± 0,318)	6,407	4	4,3
Rolândia-PR	440	1,975 (0,884 - 3,824)	0,913 (± 0,121)	9,641	5	5,3
Palmital-SP	240	1,067 (0,295 - 2,505)	0,640 (± 0,158)	0,301	2	2,9
Campo Mourão-PR	240	0,522 (0,044 - 1,327)	0,646 (± 0,189)	1,413	2	1,4

<sup>1</sup> Número total de insetos testados (tratamento + testemunha);

<sup>2</sup> Concentração letal para 50% da população (CL<sub>50</sub> (µg i. a.<sup>-1</sup>) e intervalo de confiança 95%;

<sup>3</sup> Erro padrão;

<sup>4</sup> Chi-quadrado;

<sup>5</sup> Graus de liberdade;

<sup>6</sup> Fator de resistência (CL50 população/ CL50 população mais suscetível);

<sup>7</sup> População suscetível de referência;

<sup>8</sup> População selecionada;

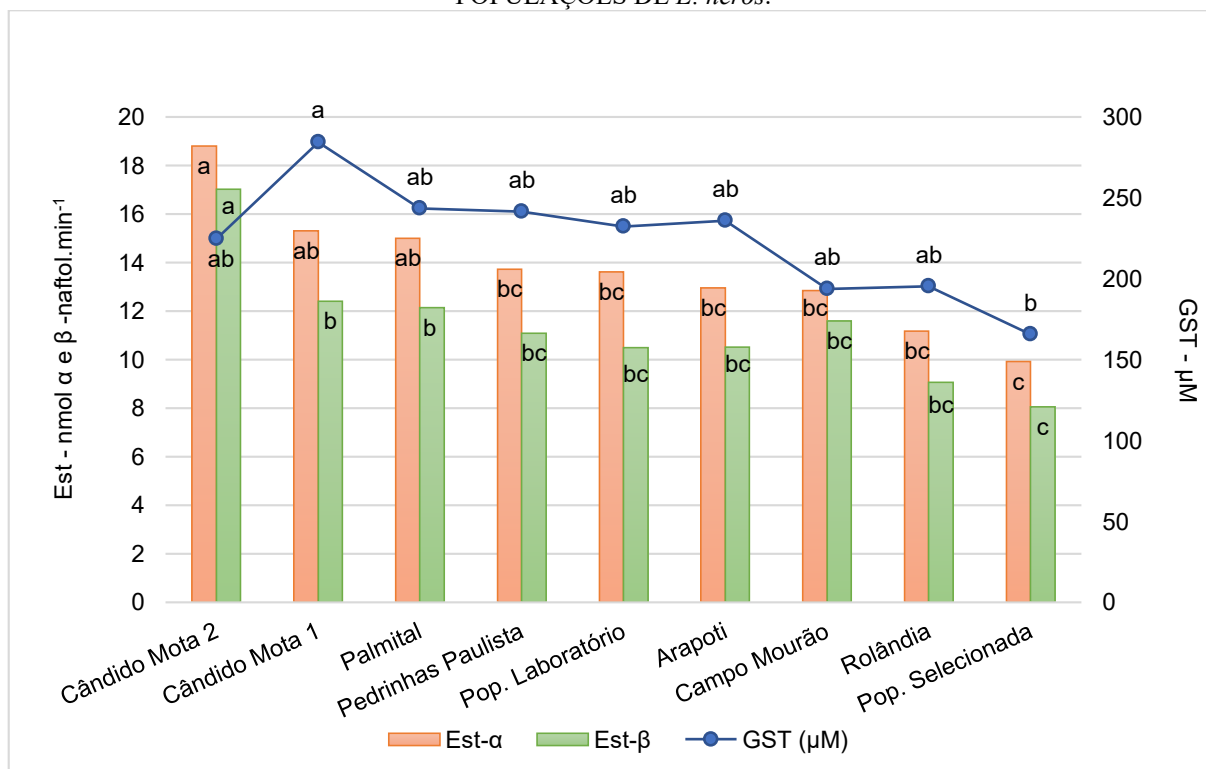
<sup>9</sup>\* Valor de chi-quadrado significativo.

Além disso, Pedrinhas Paulista e Arapoti, apresentaram as maiores taxas de resistência para o i.a. lambda-cialotrina (6,0 e 5,5 vezes, respectivamente), que apesar dos valores serem mais baixos em relação ao acefato, que há mais tempo é recomendado para o controle de percevejos, piretroides como lambda-cialotrina começaram a ter registros de falhas no controle e problemas com espécies resistentes. Piretroides também são utilizados no controle de lagartas, que em certos casos já se tem possíveis caso de falhas registrados no Brasil (SOSA-GÓMEZ;

OMOTO, 2012), e tendo em vista que as maiores populações de lagartas ocorrem na fase vegetativa da soja, o uso destes i.a. na cultura vai do início ao fim do período de safra. Porém a eficiência destes produtos no controle de percevejos não é a mesma, além de *E. heros* outras espécies do gênero *Euschistus*, o controle químico com utilização de piretroides tem sido variável (GREENE; CAPPS, 2001; WILLRICH, *et al.*, 2003, HOPKINS *et al.*, 2010).

Na segunda parte do estudo, o uso das análises enzimáticas como indicativo de populações resistentes, mostraram que Cândido Mota-SP 2 apresentou alterações nas atividades de  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase (18,8 e 17,0) e Cândido Mota-SP 1 para GST (284,6) (FIGURA 1.3). Estes dados corroboram com as avaliações de  $CL_{50}$ , tendo as mesmas populações altas taxas de resistência para acefato. O mesmo foi observado para o percevejo *L. lineolaris* importante praga do algodão na América do Norte, que tem como base de seu controle o uso de organofosforados, e assim como *E. heros*, ambos tiveram casos de resistência a estes produtos (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2011).

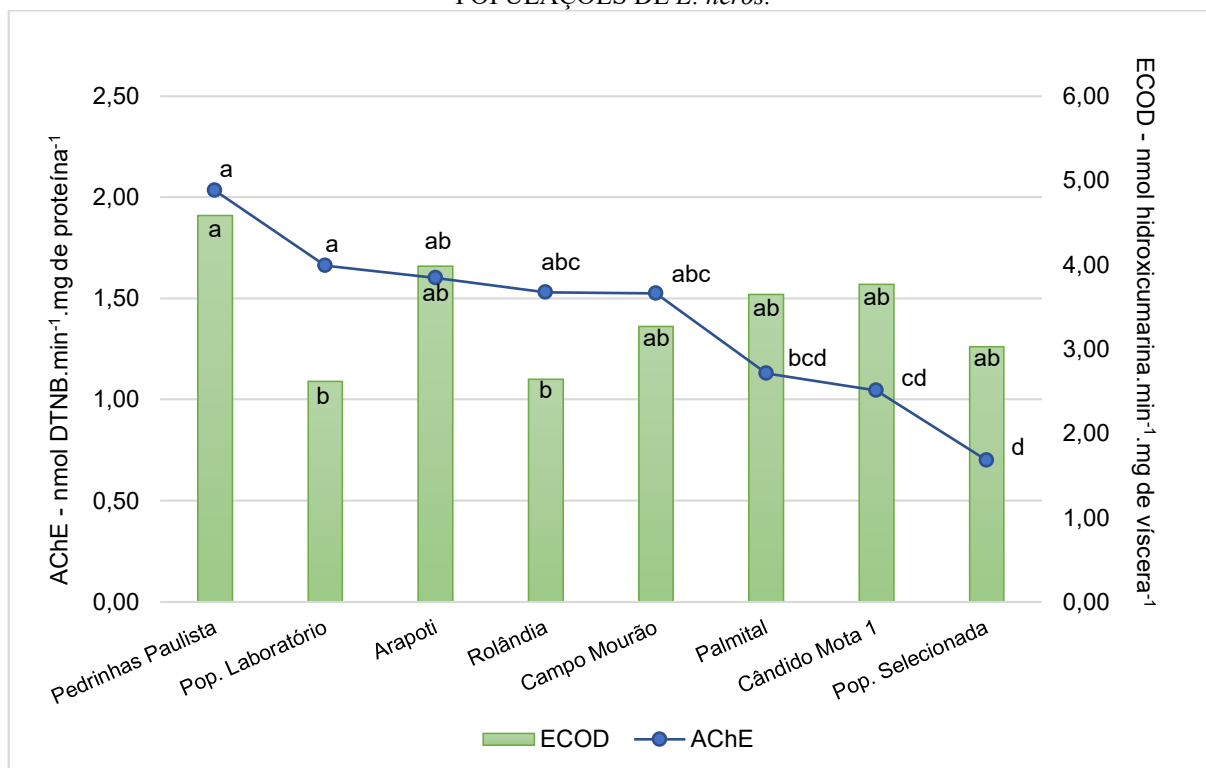
FIGURA 1.3 – GRÁFICO REPRESENTANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ESTERASE- $\alpha$  E  $\beta$  (NMOL  $\alpha$  E  $\beta$ -NAFTOL.MIN<sup>-1</sup>) E GLUTATIONA-S-TRANSFERASE – GST ( $\mu$ M) DE NOVE POPULAÇÕES DE *E. heros*.



Os dados de AChE indicaram as menores atividades desta enzima nas populações de Palmital-SP (2,71), Cândido Mota-SP (2,51) e Pop. Seleccionada (1,68), diferindo estatisticamente da população suscetível de referência (3,99) (FIGURA 1.4). Porém, a atividade da ECOD indicou Pedrinhas Paulista-SP com o maior valor (1,91), diferindo estatisticamente

da população suscetível, seguida de Arapoti-PR (1,66). Estes dados confirmam os valores obtidos para as taxas de resistência a lambda-cialotrina, indicando as mesmas populações.

FIGURA 1.4 – GRÁFICO REPRESENTANDO A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ACETILCOLINESTERASE – AChE (NMOL DTNB.MIN<sup>-1</sup>.MG DE PROTEÍNA<sup>-1</sup>) E 7-ETOXICUMARINA-O-DESETILASE – ECOD (NMOL HIDROXICUMARINA.MIN<sup>-1</sup>.MG DE VÍSCERA<sup>-1</sup>) DE OITO POPULAÇÕES DE *E. heros*.



Atualmente o controle de percevejos apresenta dificuldades devido à falta de alternativas de controle com produtos eficientes e seletivos. Esta situação poderá ser agravada pela recente limitação de uso de neonicotinoides em diversas culturas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), devido ao impacto sobre as abelhas, o que levou à abertura do processo de reavaliação do uso deste produto no Brasil (BRASIL, 2012). Além disso, a abundância de *E. heros* seguida do potencial de danos ocasionados por esta praga na cultura da soja nos últimos anos, fez dela alvo das principais aplicações de inseticidas, dificultando ainda mais o seu controle, que devido à falta de novos inseticidas e a ineficiência devido ao uso inadequado dos produtos disponíveis no mercado, medidas de prevenção já não são suficientes sem um estudo adequado da atual estrutura genética desta praga. Portanto, estudos sobre a diversidade e estrutura genética de *E. heros* são relevantes para determinar estratégias de manejo da resistência a inseticidas, pois embora seja uma praga abundante e com ampla distribuição pelo território brasileiro, pouco se conhece sobre seus níveis de fluxo gênico e sua estruturação populacional.

O monitoramento das populações baseadas na avaliação de dose-resposta e atividade enzimática fornecem informações importantes para se obter o melhor manejo dessas áreas, detectando a resistência local para tomar medidas de controle visando retardar o surgimento de novos focos.

Os resultados do estudo apontam para a necessidade de se manter o monitoramento das populações com problemas de resistência, além de realizar estratégias de manejo visto que muitas práticas foram abandonadas.

## 1.4 CONCLUSÃO

Os dados indicam a evolução da resistência em populações de *E. heros*, corroborados pelas avaliações de dose-resposta com as avaliações enzimáticas, demonstrando que as populações de Arapoti-PR, Campo Mourão-PR, Cândido Mota-SP, Palmital-SP, Pedrinhas Paulista-SP e Rolândia-PR apresentaram resistência aos produtos organofosforados, lambda-cialotrina e tiametoxam.



## 1.5 REFERÊNCIAS

- ADELMAN, Z.N. *et al.* Deep sequencing of pyrethroid resistant bed bugs reveals multiple mechanisms of resistance within a single population. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- ALIZADEH, M. *et al.* Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanism in two populations of *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae). **Munis Entomology & Zoology Journal**, v. 5, n. 2 p. 734 – 744, 2010.
- ALOUT, H. *et al.* A new aminoacid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 41-47, 2007.
- BARROS, R.; DEGRANDE, P. E. Desempenho do algodão-Bt como tática de controle de pragas em condições de campo. **Científica**, v.40, n.2, p.117 – 137, 2012.
- BASS, C. *et al.* Genomic resources for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Transcriptome pyrosequencing and microarray design, **Insect Science**, v. 19, p. 1-12, 2012.
- BECKEL, H. dos S. *et al.* Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 110-114, 2006.
- BOCQUENE, G.; GALGANI, F. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, n. 22, p 1-12, 1998.
- BOUVIER, J. C. *et al.* Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 55-64, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***. 1 ed. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. IBAMA, Comunicado. Diário Oficial da União – Seção 3. P. 112. N.º139. 19 de jul. 2012. ISSN 1677-7069.
- BURR, I.W.; FOSTER, L.A. **A test for equality of variances**. (Mimeo Series, 282) West Lafayette: University of Purdue, 1972.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. *et al.* **Práticas de manejo de pragas utilizadas na soja e seu impacto sobre a cultura.** Londrina: Embrapa Soja, 16p. (Embrapa Soja: Circular Técnica, 78), 2010.

CORSEUIL, E. *et al.* **Insetos nocivos a soja no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRGS – Faculdade de Agronomia, 1974.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, v. 82, n. 3, p. 83-90, 1995.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. *et al.* The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, p. 163-170, 2004.

GREENE, J. K.; CAPPS, C. Laboratory evaluations of cotton insecticides for control of stink bugs. **Summaries of Arkansas Cotton Research**, 2001, p. 202-209, 2001.

GUNNING, R. V.; MOORES, G. D. Insensitive acetylcholinesterase as sites for resistance to organophosphat and carbamat in insect: In: ISHAAYA, I. (ed.). **Biochemical Site of Insecticide Action and Resistance.** Berlin Heidelberg, Springer B Verlag, 2001. p. 221-238.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1009-1015, 2000.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brown wheat mite, **Journal of Economic Entomology**, v.48, p.157-161, 1955.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. *et al.* **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga.** Brasília, DF: Embrapa, 2012.

HOPKINS, B.W. *et al.* Species composition, damage potential, and insecticide susceptibility of stink bugs in cotton in the Lower Gulf Coast region of Texas. **Southwestern Entomology**, v. 35, n.19, p. 32, 2010.

HUSCH, P. E. *et al.* Characterization of injury caused by *Edessa meditabunda* (F.), *Chinavia impicticornis* (Stål), and *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pentatomidae) to soybean. **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 276–281, 2014a.

HUSCH, P. E. *et al.* Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Euschistus heros* a tiametoxam+lambda-cialotrina e acefato. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 34., 2014, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja. p. 78-79, 2014b.

JONES, C. M. *et al.* Age-specific expression of a P450 monooxygenase (CYP6CM1) correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, p. 53-58, 2011.

KEEN, J. H. *et al.* Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. **Journal Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

LI, H. *et al.* Effect of temperature on toxicity of pyrethroids and endosulfan, activity of mitochondrial Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 151-156, 2006.

LEORA SOFTWARE. **POLO-Plus 1.0 Probit and Logit analysis**. Petaluma, California. 2003.

LÓPEZ, J. E. *et al.* Toxicity to adult brown stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) in a glass-vial bioassay of selected insecticide mixtures. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 4, p. 459-466, 2012.

MARKUSSEN, M. D. K.; KRISTENSEN, M. Cytochrome P450 monooxygenase mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 50-58, 2010.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no Norte do Paraná. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 205-218, 2000.

PANIZZI, A. R. *et al.* Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood 1837) no rendimento e qualidade da soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA SOJA, 1, 1979, Londrina, **Anais...**, Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979, p. 59-78.

PANIZZI, A.R.; NIVA, C.C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 509-511, 1994.

PANIZZI, A. R.; OLIVEIRA, E. D. M. Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (Pigeonpea) and soybean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 169-175, 1998.

PARENTE, R. C. P. **Aspectos da análise de resíduos**. 139f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1984.

PICOLLO, M. I. *et al.* High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, n. 42, p. 637-642, 2005.

PUINEAN, A. M. *et al.* Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 6, p. 1-11, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's Guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SILVA, W. M. *et al.* Status of pyrethroids resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, n. 2 p.317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide Susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 3, p. 1209-1216, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Variabilidade de resposta de subpopulações de *Euschistus heros* (F.) a mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 32., São Pedro, São Paulo, **Resumos expandidos**. Londrina: Embrapa, 2011. p. 80-81.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, n. 24, v. 2, p.401-404, 1995.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B. CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012, p. 673-723.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n.7, p.767-769, jul. 2010.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v. 5, p. 232-242, 1949.

WILLRICH, M. M. *et al.* Evaluation of insecticides for control of nymph and adult southern green stink bugs, 2002. **Arthropod Management Tests** 28:F77, 2003. Disponível em: <<http://www.entsoc.org/Protected/AMT/AMT28/INDEX/ASP>>. Acesso em: 20/01/2016.

WILLRICH, M. M. *et al.* Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Cotton Science**, v. 7, n. 4, p. 156-163, 2003.

ZHU, Y. C. *et al.* Variability in resistance related enzyme activities in field populations of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 265-273, 2011.

## **CAPÍTULO 2**

### **ESTRUTURA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES GEOGRÁFICAS NO BRASIL**

## RESUMO

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) está entre as principais pragas da cultura da soja, tornando-se alvo constante nas aplicações de inseticidas nos últimos anos, o que tem ocasionado problemas de resistência. Estudos sobre a estrutura genética populacional de espécies de importância agrícola, tais como *E. heros*, podem fornecer informações relevantes para o manejo integrado de pragas (MIP). Neste trabalho utilizamos oito locos microssatélites para investigar a diversidade e estrutura genética de populações de *E. heros* amostradas em 20 pontos de coleta, abrangendo os principais estados produtores de soja do Brasil. A maior diversidade genética foi encontrada na amostra de Pedrinhas Paulista, SP ( $H_E = 0,916$ ), e a menor para a amostra de São Desidério, BA ( $H_E = 0,831$ ). As amostras de São Desidério, BA e Sorriso, MT foram as que apresentaram o menor número de alelos ( $A = 90$  e  $89$ , respectivamente), média de alelos por loco ( $N_A = 11,3$  e  $11,1$ ) e de alelos efetivos por loco ( $N_E = 9,0$  e  $7,8$ ), enquanto que a de Pedrinhas Paulista, SP apresentaram os maiores valores para esses índices ( $A = 138$ ,  $N_A = 17,2$  e  $N_E = 14,0$ ). A riqueza alélica ( $R_A$ ), calculada com base em oito indivíduos por amostra, variou de  $8,424$  (São Desidério, BA) a  $11,632$  (Pedrinhas Paulista, SP/13). Todas os pontos amostrados apresentaram valores significativos para o índice de endogamia  $F_{IS}$ . A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior parte da variação ocorreu dentro de populações (99,09%), enquanto apenas 0,99% ocorreu entre elas. Corroborando estes resultados, altos níveis de fluxo gênico (estimativa  $M \times \Theta$ ) foram obtidos, com as maiores estimativas de migração de Arapoti-PR para Sertaneja, PR (42,48 migrantes por geração) e para Londrina, Warta, PR (40,36). As menores estimativas de migração foram obtidas para a amostra de São Desidério, BA, a qual também mostrou a tendência de ser a mais distante das populações remanescentes a partir os valores de distância genética. Uma hipótese plausível para não haver estruturação genética entre essas populações, pode estar ligada a fatores biológicos e evolutivos, tais como ampla distribuição geográfica dessa espécie ao longo do território brasileiro, capacidade migratória influenciada pela expansão das áreas de produção de soja, e a abundância dessa praga no período de safra.

Palavras-chave: percevejo da soja, diversidade genética, microssatélites.

## ABSTRACT

The Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) is among the major soybean pests. Therefore, it is a constant target of insecticide applications in the last few years, which has been artificially selecting them for resistance to these products. Studies of the population genetic structure of agronomically important insect species such as *E. heros*, can provide relevant information to implement the integrated pest management (IPM). In the present study, we used eight microsatellite loci to investigate the genetic diversity and structure of *E. heros* populations sampled in 20 collection points, within the major soybean producing regions in Brazil. The greatest genetic diversity was found in the sample collected in Pedrinhas Paulista (SP) ( $H_E = 0.916$ ), whereas the smallest was registered for the sample from São Desidério (BA) ( $H_E = 0.831$ ). The samples collected in São Desidério and Sorriso (MT) presented the smallest number of alleles ( $A = 90$  and  $89$ , respectively), average number of alleles per locus ( $N_A = 11.3$  and  $11.1$ ), and effective alleles per locus ( $N_E = 9.0$  and  $7.8$ ), while those from Pedrinhas Paulista showed the highest values for these parameters ( $A = 138$ ;  $N_A = 17.2$ ;  $N_E = 14$ ). The allelic richness (AR), calculated based on eight individuals per sample, ranged from  $8.424$  (São Desidério) to  $11.632$  (Pedrinhas Paulista). All the sampling points presented significant values for the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that most of the variance took place within the populations ( $99.09\%$ ), while only  $0.99\%$  occurred between them. Corroborating these results, high levels of gene flow (estimated  $M \times \Theta$ ) were obtained with the highest estimates of migration from Arapoti (PR) to Sertaneja (PR) ( $42.48$  migrants per generation) and to Londrina, District of Warta (PR) ( $40.36$ ). The lowest estimates of migration were found for the sample collected in São Desidério, which also showed tendency to be the most distant of the remaining populations based on the results found for genetic distance. A plausible hypothesis for the lack of genetic structuration between these populations may be connected with biological and evolutionary factors, such as the broad geographic distribution of the species in Brazil, migration capacity influenced by the expansion of soybean production areas, and abundance of this insect pest in the growing season.

Keywords: stink bug, genetic diversity, microsatellites.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O percevejo marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), é uma espécie nativa da região Neotropical (MEDEIROS; MEIGER, 2009) e está entre as principais pragas da cultura da soja (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010). As populações deste percevejo têm sido excessivamente elevadas nos últimos anos, principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sul do Brasil (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010; SILVA *et al.*, 2014; SMANIOTTO; PANIZZI, 2015), fato que tem dificultado o seu controle, exigindo um número maior de aplicações de inseticidas (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010). Além disto, focos de resistência a agrotóxicos também tem sido registrados para esta espécie (SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010). Segundo Sosa-Gómez e Omoto (2012) esta resistência poderia estar relacionada ao baixo fluxo gênico e número de gerações que ocorrem durante o ciclo da cultura de soja.

A evolução da resistência pode ser influenciada por diversos fatores, como a mutação, seleção, deriva genética e fluxo gênico (migração) (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2005). Estudos sobre a diversidade e estrutura genética de *E. heros* são relevantes para determinar estratégias de manejo da resistência, por ser uma praga abundante e com ampla distribuição pelo território brasileiro, pouco se conhece sobre os níveis de fluxo gênico, diversidade e estrutura genética das populações desta espécie de percevejo. Para este tipo de estudo o uso de marcadores microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*) possui a vantagem de serem marcadores codominantes, multi-alélicos e amplamente distribuídos no genoma, o que pode proporcionar resolução adequada para estudos de variabilidade intraespecífica (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Não por acaso, tais marcadores estão entre os mais utilizados em estudos sobre a estrutura e diversidade de populações de diferentes organismos nas últimas décadas, sendo muitos destes estudos com insetos praga (CHEN; DORN, 2010; CHAPUIS *et al.*, 2011; FONTES *et al.*, 2012; VALLE *et al.*, 2013). Devido à elevada taxa de mutações dos SSR comparado a de outros marcadores, os microssatélites são capazes de discriminar diferenças significativas entre populações e genótipos, além de detectar recentes alterações na história evolutiva das espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Diversos estudos têm utilizado com sucesso estes marcadores na análise de espécies pragas (DOMINGUES *et al.*, 2012; KIRK *et al.*, 2013; PAVINATO *et al.*, 2012). Portanto, conhecer a composição genética de espécies de importância agrônômica, como a estrutura populacional e o fluxo gênico, são informações relevantes e que servem de base para os estudos de manejo integrado de pragas (MIP) (BUSATO *et al.*, 2004; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2004; DOMINGUES *et al.*, 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi



analisar a diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *E. heros* das principais regiões produtoras de soja do Brasil, com o uso de marcadores microssatélites.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Desenvolvimento e caracterização de locos microssatélites

O DNA genômico foi extraído de um único indivíduo de *E. heros* utilizando o kit Rogers e Bendich (1988). O isolamento dos microssatélites foi realizado pela empresa Genetic Marker Services (Brighton, United Kingdom; [www.geneticmarkerservices.com](http://www.geneticmarkerservices.com)). De acordo com o protocolo descrito por Edwards *et al.* (1996) com algumas modificações propostas por Gonzáles *et al.* (2015) e Letelier *et al.* (2015), uma biblioteca genômica enriquecida foi construída para *E. heros*. O DNA genômico (200 ng) foi digerido com *RsaI* e os fragmentos originados foram ligados a um adaptador *MluI* e amplificados a partir de PCR (GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Fragmentos com regiões microssatélites foram selecionados a partir das sondas AG, AC, AAC, CCG, CTG e AAT e subsequentemente clonados. Um total de 37 clones recombinantes foram selecionados e sequenciados utilizando o kit Big Dye Terminator™ (v 3.1 - Applied Biosystems). As sequências foram analisadas usando o programa BioEdit v.7.0 (HALL, 1999) e os pares de primers foram desenhados para 17 locos utilizando o programa Primer 3 (ROZEN; SKALETISKY, 2000). O programa AutoDimer (VALLONE; BUTLER, 2004) foi utilizado para testar as possibilidades de problemas com a formação de alças e dímeros entre os primers.

Os locos selecionados foram testados em diferentes condições de amplificação, e submetidos a genotipagem individual em sequenciador automático (ABI-PRISM 3500 xL), conforme o protocolo descrito por Giangarelli *et al.* (2015). Para a realização de leitura em sequenciador automático foi acrescentado uma sequência adicional M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') a extremidade 5' do *primer forward* de cada loco, possibilitando a marcação dos produtos de PCR com fluorescências (SCHUELKE, 2000).

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 10 µl contendo 1X GoTaq Master Mix Color Less (Promega), 1% de glicerol, 0.125 µM de Primer Reverse, 0,0125 µM de Primer Forward e 0.125 µM M13 µM marcado com fluorescência FAM, HEX, NED e PET (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), e 10 ng da amostra de DNA. As reações foram conduzidas em termociclador ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Applied Biosystems) programado para realizar a desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguidos por 10 ciclos a 94°C

por 30 s, 48°C, 54°C, 58°C ou 60°C por um min. e 72°C por 1 min, seguidos por 25 ciclos de 89°C por 30 s, 48°C, 54°C, 58°C ou 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 72°C por 30 min (GIANGARELLI *et al.*, 2015).

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems), utilizando como marcador de peso molecular GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems). A leitura dos genótipos foi realizada no programa GeneMarker v.1.85 (SoftGenetics LLC, State College, PA).

Dos 17 locos testados, oito (Eus10, Eus14, Eus23, Eus25, Eus56, Eus57, Eus58 e Eus77) foram avaliados quanto a aplicabilidade em estudos populacionais a partir da análise de 30 indivíduos de culturas de soja do Paraná (TABELA 2.2).

A quantidade de alelos ( $A$ ) e as heterozigosidades observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) foram estimadas no programa GenAlEx v. 6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). O índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi estimado no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) e o PIC (conteúdo de informação polimórfica) no programa Cervus v. 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998). A identidade gênica ( $I$ ) (PAETKAU *et al.*, 1995) e a exclusão de paternidade ( $Q$ ) (WEIR, 1996) foram estimados no programa Identity v. 1.0 (WAGNER; SEFC, 1999) (FIGURA 3.2).

Possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e a presença de desequilíbrios de ligação foram avaliados no programa Genepop v. 1.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995), com os valores de  $\alpha$  para a probabilidade ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Alelos nulos, picos “stutters” e outros erros de genotipagem foram avaliados no programa MicroChecker 2.2.1 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

## 2.2.2 Estudo da estrutura e diversidade de populações de *E. heros*

### 2.2.2.1 Amostragem

As populações foram coletadas em campo, provenientes de 17 localidades (20 pontos amostrados) (TABELA 2.1) com produção de soja no Brasil (FIGURA 2.1). Sendo que, para cada localidade, foram separados em média 15 indivíduos para extração de DNA.

TABELA 2.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE *E. heros*. (CONTINUAÇÃO)

Código	Populações	Coordenadas Geográficas	Data de coleta
BV.PR	Bela Vista do Paraíso, PR	S 22°54'12.8" W 51°14'44.9"	abril/2013
Igu.PR	Iguaraçu, PR	S 23°13'30.6" W 51°48'18.8"	maio/2013
Ser.PR	Sertaneja, PR	S 22°56'45.8" W 50°56'30.9"	abril/2013

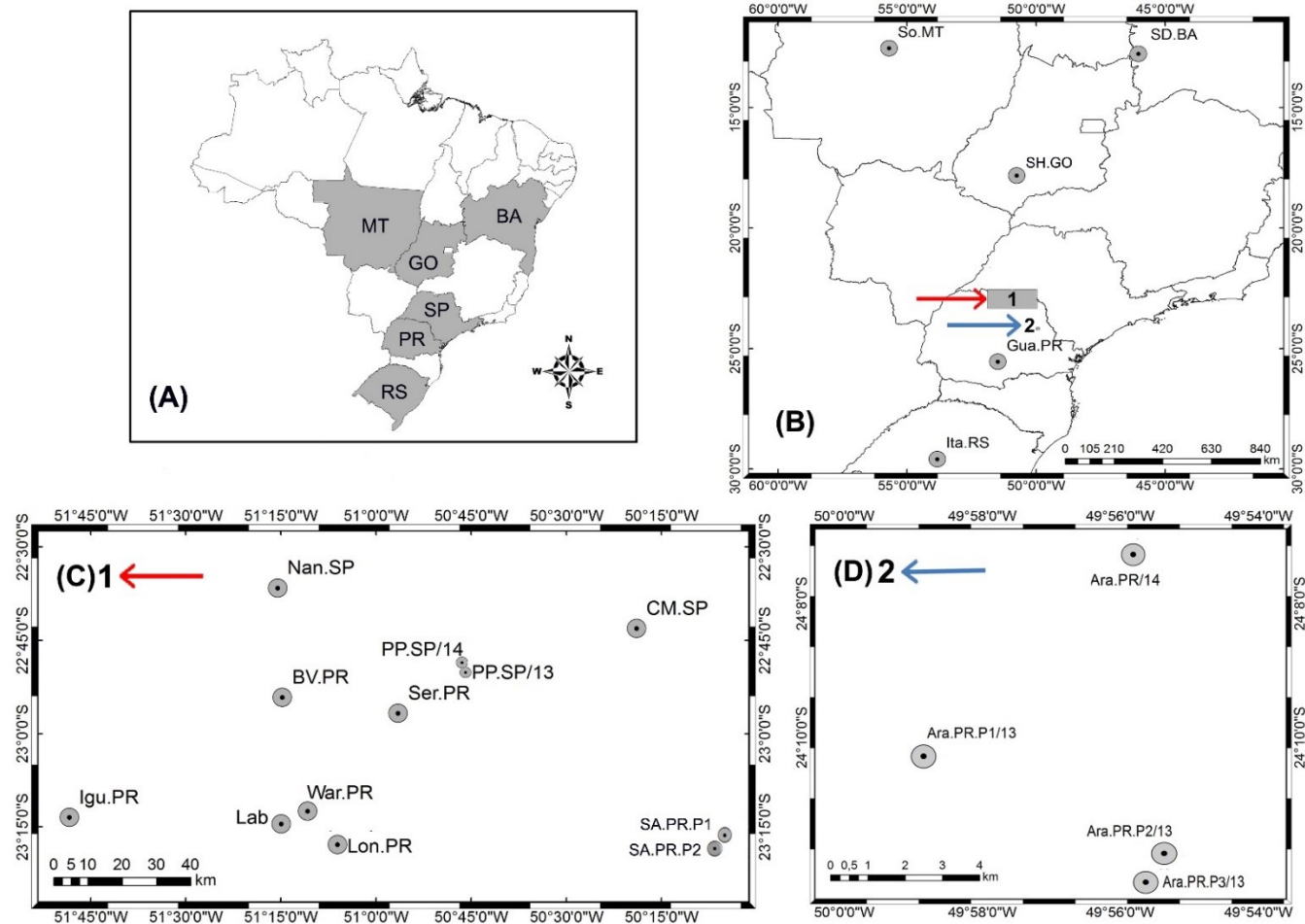
TABELA 2.1 – INFORMAÇÕES DE COLETA DAS POPULAÇÕES DE *E. heros*. (CONCLUSÃO)

Código	Populações	Coordenadas Geográficas	Data de coleta
CM.SP	Cândido Mota, SP	S 22°43'07.8" W 50°18'56.3"	abril/2013
Ara.PR.P1/13	Arapoti, PR – Ponto 1, 2013	S 24°10'11.0" W 49°56'17.5"	maio/2013
Ara.PR.P2/13	Arapoti, PR – Ponto 2, 2013	S 24°11'55.8" W 49°55'12.4"	
Ara.PR.P3/13	Arapoti, PR – Ponto 3, 2013	S 24°12'14.4" W 49°55'34.9"	
SA.PR.P1	Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 1	S 23°15'42.6" W 50°06'12.9"	junho/2013
SA.PR.P2	Santo Antônio da Platina, PR – Ponto 2	S 23°16'41.6" W 50°07'03.2"	
War.PR	Londrina, Distrito da Warta, PR	S 23°12'15.7" W 51°10'56.8"	março/2013
Nan.SP	Nantes, SP	S 22°36'37.1" W 51°15'28.6"	maio/2013
PP.SP/13	Pedrinhas Paulista, SP – 2013	S 22°49'09.1" W 50°45'50.2"	abril/2013
PP.SP/14	Pedrinhas Paulista, SP – 2014	S 22°48'11.4" W 50°46'12.6"	março/2014
SH.GO	Santa Helena de Goiás, GO	S 17°50'07.3" W 50°34'51.4"	março/2014
Ara.PR/14	Arapoti, PR – 2014	S 24°11'58.0" W 49°55'52.1"	março/2014
Lon.PR	Londrina, PR	S 23°17'53.0" W 51°06'04.0"	março/2014
Ita.RS	Itaara, RS	S 29°35'31.7" W 53°49'18.9"	março/2014
Gua.PR	Guarapuava, Distrito de Entre Rios, PR	S 25°33'09.9" W 51°28'41.1"	abril/2014
SD.BA	São Desidério, BA	S 12°46'23.7" W 46°01'53.6"	maio/2015
So.MT	Sorriso, MT	S 12°32'36.8" W 55°41'15.9"	abril/2015

#### 2.2.2.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico de 243 percevejos, provenientes de 17 pontos de amostragem (TABELA 2.1), foi obtido a partir do protocolo de Rogers e Bendich (1988), com algumas modificações. Foram usadas apenas a cabeça e as pernas de cada indivíduo para evitar uma possível contaminação com a presença de microorganismos como bactérias, protozoários e nematoides que ocorrem naturalmente na hemolinfa (FUXA *et al.*, 2000; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2002). A integridade do DNA foi verificada por eletroforese, conduzida em tampão TBE 1X, a 120V por 1 hora em gel de agarose 1%, corado com 10 mg.ml<sup>-1</sup> de brometo de etídio e visualizado em transiluminador L-PIX- ST e L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, no programa de captura de imagem L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP). A concentração do DNA foi determinada com um espectrômetro Nanodrop 8000 (Thermo científico, Wilmington, DE) e as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng de DNA total.μl<sup>-1</sup>.

FIGURA 2.1 – PONTOS DE COLETA DE *E. heros*; (A) ESTADOS BRASILEIROS ONDE FORAM REALIZADAS COLETAS; (B) DESTAQUE DOS PRINCIPAIS PONTOS AMOSTRADOS, COM ÊNFASE NO ESTADO DO PARANÁ; (C) 1 PRINCIPAIS PONTOS DE COLETA DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ; (D) 2 PONTOS AMOSTRADOS NO MUNICÍPIO DE ARAPOTI-PR.



ORGANIZAÇÃO: ROZA, W. S. S. FONTE: IBGE, 2014.

TABELA 2.2 – DESCRIÇÃO DE OITO LOCOS MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS ISOLADOS PARA A O PERCEVEJO *E. heros* E RESULTADOS PARA CADA UM DOS PRIMERS FLANQUEADORES.

Loci	Primers (5' – 3')	Motif	T <sub>A</sub> (°C) <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	Pb <sup>3</sup>	H <sub>O</sub> <sup>4</sup>	H <sub>e</sub> <sup>5</sup>	Q <sup>6</sup>	I <sup>7</sup>	PIC <sup>8</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>9</sup>
Eus10	F: AAAGTTAGGTCGGAAATTGTTAG R: ATGCAAGCACACACGAACAC	(TG) <sub>14</sub>	58	12	150	0,767	0,851	0,712	0,037	0,837	0,116
Eus14	F: GTACAGTTTATTTTAAAAGTAATTA R: TGTGCCCCGAAGACCTTATCT	(AC) <sub>21</sub>	54	25	188	0,500* <sup>10</sup>	0,950	0,902	0,005	0,947	0,487 <sup>#11</sup>
Eus23	F: TTCCGGTAGAACCAACAAGG R: ATCGCTGAGGGAACAAACAAA	(AC) <sub>24</sub>	58	31	115	0,750*	0,957	0,916	0,003	0,956	0,234 <sup>#</sup>
Eus25	F: GAGTCGTCTTTACCAAGGGAGA R: TCCAATTTCTTTTGCTCCA	(AC) <sub>36</sub>	54	25	144	0,414*	0,942	0,888	0,006	0,939	0,573 <sup>#</sup>
Eus56	F: TCAGAATGTAGGCGAACCTG R: CCGGTGTTAATAGGCGAACT	(CT) <sub>10</sub> TT (CT) <sub>7</sub>	58	13	269	0,481*	0,811	0,697	0,040	0,795	0,422 <sup>#</sup>
Eus57	F: TGAATGCTGGAAGTATGGAA R: GGTAATCTTCCAAGTGTTC	(TG) <sub>19</sub>	45	32	211	0,750*	0,963	0,877	0,007	0,961	0,241 <sup>#</sup>
Eus58	F: ACCGATAGCGAAGTAAATTTGT R: CCAAAAACAATCAGCCTAACC	(AC) <sub>26</sub>	58	22	198	0,800*	0,931	0,861	0,009	0,927	0,157 <sup>#</sup>
Eus77	F: CCAAAAACAATCAGCCTAACC R: GGAGGTTTCAATTATCCATTCG	(TG) <sub>37</sub>	54	36	202	0,900	0,966	0,930	0,002	0,964	0,085 <sup>#</sup>
Todos				25		0,670	0,921	0,999	1,74,10 <sup>-17</sup>	0,916	0,289 <sup>#</sup>

<sup>1</sup> T<sub>A</sub> – temperatura de anelamento; <sup>2</sup> A – número de alelos; <sup>3</sup> Pb – tamanho dos alelos em pares de base; <sup>4</sup> H<sub>O</sub> – heterozigosidade observada; <sup>5</sup> H<sub>e</sub> – heterozigosidade esperada; estimados a partir de 30 indivíduos; <sup>6</sup> Q – probabilidade de exclusão de paternidade; <sup>7</sup> I – probabilidade de identidade gênica; <sup>8</sup> PIC – conteúdo de informação polimórfica <sup>9</sup> F<sub>IS</sub> – coeficiente de endogamia; <sup>9</sup> \* – desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ); <sup>10</sup> # – valor significativo par o coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>).

### 2.2.2.3 Análise de dados

A diversidade genética das populações de *E. heros* foi analisada através dos programas: 1) GenAlEx v.6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), para calcular a quantidade de alelos (A), número de alelos privados ( $N_P$ ), número médio de alelos por amostra ( $N_A$ ), número de alelos efetivos ( $N_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_E$ ); 2) o Fstat v. 2.9.3 (GOUDET, 2001), para calcular a riqueza alélica; 3) Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) para estimar o  $F_{IS}$  (índice de endogamia) por locos e por população; 4) Genepop v. 1.2 (RAYMOND; ROUSSET, 1995), para o cálculo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação, com valores de  $\alpha$  ajustados a partir da correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989); 5) MicroChecker v. 2.2.1 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) para verificar a presença de alelos nulos, alelos *drop-out*, picos *stutters* e outros erros de genotipagem.

Possíveis gargalos genéticos populacionais recentes, foram avaliados utilizando o *software* Bottleneck v. 1.2.02 (PIRY *et al.* 1999), aplicando os testes de “*Mode-shift*”, que verifica sinais de gargalos genéticos a partir de alterações na distribuição das frequências alélicas (LUIKART *et al.* 1998), o “*Sign test*” (CORNUET; LUIKART, 1996) e “*Wilcoxon sign-rank test*” (LUIKART; CORNUET, 1998), os quais indicam sinais de gargalos genéticos a partir de valores significativos de excesso de heterozigosidade, a partir de diferentes modelos evolutivos, *Infinite alleles Model* (IAM), *Two-Phase Model* (TPM – com 70% SMM e 30% IAM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM).

Com relação à análise da estrutura genética foram utilizados os programas: 1) Arlequin v. 3.11 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) para calcular a AMOVA (Análise da Variância Molecular), a qual descreve a partição da variação genética dentro e entre populações, e também para estimar o índice de diferenciação genética populacional  $\Phi_{ST}$  par a par, com base em 10.000 permutações para estimativas de significância; 2) TFPGA (MILLER, 1997) para construir o dendograma, usando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) e da distância genética de Nei (1972), usando um bootstrap de 1000 repetições; 3) STRUCTURE v. 2.3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000) para verificar a estrutura genética entre as populações por meio de inferência Bayesiana, usando o modelo de ancestralidade “*admixture ancestry model*”, com alelos correlacionados. As estimativas do número de populações (K), foram realizadas variando de um a oito ( $K = 1$  a 20) (EVANNO *et al.*, 2005), reproduzindo 20 corridas para cada valor de K, com 50.000 interações no “*burn-in*” e 500.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC); 4) O aplicativo Structure Harvester v. 0.6.94 (EARL;

VON HOLDT, 2012) foi utilizado para estimar o valor de K que melhor se ajusta aos dados, com base nos critérios propostos por Evanno *et al.*, (2005) ( $\Delta K$ ) e Pritchard e Wen (2004) (likelihood  $\ln(K)$ ); 5) CLUMPP v. 1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e DISTRICT v. 1.1 (ROSENBERG, 2004), programas usados para gerar o gráfico da estruturação genética.

A análise de fluxo gênico das amostras de *E. heros* foi realizada no programa MIGRATE v. 3.6.4 (BEERLI; PALCZEWSKI, 2010), estimando as taxas de migração (M) e o tamanho efetivo populacional ( $\Theta$ ). Para isso foi utilizada uma estimativa de máxima verossimilhança, calculada a partir de cadeias MCMC, incluindo 10 cadeias curtas com 1.000 genealogias seguidas de três cadeias longas com 10.000 genealogias e um burn-in de 10.000. A estimativa de imigrantes por geração foi obtida a partir da multiplicação de  $\Theta \times M$ .

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Desenvolvimento e caracterização de locos SSR em *E. heros*

De um total de 17 locos, oito (Eus10, Eus14, Eus23, Eus25, Eus56, Eus57, Eus58 e Eus77) mostraram boas condições de amplificação e ótimos níveis de polimorfismo, ou seja, padrões de amplificação e alelos bem definidos (TABELA 2.2). Os 30 indivíduos utilizados para a caracterização dos locos resultaram em um total de 196 alelos, média de 24,5 alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,414 (Eus25) a 0,900 (Eus77) e 0,811 (Eus56) a 0,966 (Eus 77), respectivamente. Nenhuma das combinações de loco apresentou desequilíbrio de ligação após a correção sequencial de Bonferroni, porém dos oito locos analisados, seis deles (Eus14, Eus23, Eus25, Eus56, Eus57 e Eus58) apresentaram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $P < 0,05$ ). O programa MicroChecker indicou alelos nulos em 7 locos. Endogamia significativa ( $F_{IS}$ ) foi observada em quase todos os locos, com exceção de Eus10.

Um alto valor da probabilidade combinada de exclusão de paternidade (Q) (0.999), e um baixo valor para a probabilidade combinada de identidade gênica ( $1.74 \cdot 10^{-17}$ ) foi obtido, demonstrando que o conjunto de locos possui ótima aplicabilidade em estudos de diferenciação populacional. O índice de conteúdo de informação polimórfica (PIC) demonstrou que os oito locos selecionados são altamente informativos, com valores iguais ou superiores a 0,795 (TABELA 2.2).

### 2.3.2 Estudo populacional de *E. heros* em culturas de soja do Brasil

#### 2.3.2.1 Diversidade genética e gargalo genético

A genotipagem de 243 indivíduos de *E. heros*, amostrados em 17 pontos de coleta nas principais regiões produtoras de soja do Brasil, resultaram em uma média de 122 alelos por amostra (TABELA 2.1). O número de alelos por amostra variou de 89 (So.MT) a 138 (PP.SP/13), com uma média de alelos por loco ( $N_A$ ) e alelos efetivos ( $N_E$ ) variando de 11.1 a 17.2 e 7.8 a 14.0, respectivamente (TABELA 2.1). Para os seguintes parâmetros de diversidade genética, as variações encontradas foram: a) riqueza alélica ( $R_A$ ): 8.424 (SD.BA-1) a 11.632 (PP.SP/13); b) heterozigosidade observada ( $H_O$ ): variou de 0,585 (Nan.SP) a 0,722 (War.PR); c) heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variaram de 0,831 (SD.BA) a 0,916 (PP.SP/13). número de alelos privados ( $N_P$ ) variou de dois (BV.PR a So.MT) a 11 (Ita.RS). Todas as populações apresentaram valores significativos para o índice de endogamia  $F_{IS}$ , da mesma forma desvios significativos ( $P < 0,05$ ) no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram obtidos para todas as amostras, variando de três (War.PR e PP.SP/14) a oito locos (SH.GO) por amostra.



TABELA 2.3 – PARÂMETROS DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *E. heros*, OBTIDOS A PARTIR DE OITO MARCADORES MICROSSATÉLITES.

AMOSTRAS	MICROSSATÉLITE									
	N <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	N <sub>p</sub> <sup>3</sup>	R <sub>A</sub> <sup>4</sup>	N <sub>A</sub> <sup>5</sup>	N <sub>E</sub> <sup>6</sup>	H <sub>o</sub> <sup>7</sup>	H <sub>e</sub> <sup>8</sup>	F <sub>IS</sub> <sup>9</sup>	HWE <sup>(Eus)</sup> 11
BV.PR	15	126	2	11,304	15,750	12,625	0,678	0,895	0,213* <sup>10</sup>	5 (Eus 14. 23. 25. 56. 57)
Igu.PR	13	114	4	10,918	14,250	11,660	0,658	0,900	0,079*	4 (Eus 14. 25. 56. 57)
Ser.PR	15	126	5	11,096	15,750	12,365	0,675	0,905	0,124*	4 (Eus 25. 56. 57. 77)
CM.SP	15	131	5	11,179	16,375	12,262	0,637	0,911	0,179*	4 (Eus 14. 25. 56. 58)
Ara.PR/13	14	122	7	11,221	15,250	12,254	0,639	0,905	0,289*	6 (Eus 14. 23. 25. 56. 57. 58)
SA.PR	14	113	6	10,604	14,125	11,331	0,634	0,893	0,196*	4 (Eus 14. 25. 56. 57)
War.PR	14	121	7	11,014	15,125	11,579	0,722	0,905	0,105*	3 (Eus 14. 56. 57)
Nan.SP	14	120	3	11,055	15,000	11,603	0,585	0,896	0,273*	5 (Eus 14. 25. 56. 57. 77)
PP.SP/13	15	138	4	11,632	17,250	14,000	0,687	0,916	0,211*	4 (Eus 25. 56. 57. 58)
PP.SP/14	15	135	5	11,130	16,875	11,755	0,689	0,889	0,215*	3 (Eus 14. 25. 57)
SH.GO	15	127	3	10,901	15,875	12,459	0,616	0,893	0,292*	8 (Eus 10. 14. 23. 25. 56. 57. 58. 77)
Ara.PR/14	14	118	3	10,801	14,750	11,159	0,679	0,897	0,134*	5 (Eus 14. 23. 25. 57. 58)
Lon.PR	15	131	5	11,242	16,375	12,787	0,662	0,906	0,258*	5 (Eus 14. 25. 56. 57. 58)
Ita.RS	15	129	11	10,982	16,125	11,924	0,640	0,907	0,197*	5 (Eus 14. 25. 56. 57. 77)
Gua.PR	15	135	7	11,254	16,875	12,975	0,619	0,904	0,242*	7 (Eus 14. 23. 25. 56. 57. 58. 77)
SD.BA	15	90	5	8,424	11,250	7,843	0,667	0,831	0,295*	5 (Eus 10. 23. 25. 57. 77)
So.MT	10	89	2	10,125	11,125	8,955	0,602	0,862	0,331*	6 (Eus 14. 23. 25. 56. 57. 77)
Média		122	5	10.875	15.184	11.737	0.652	0.895		

<sup>1</sup> N – número de indivíduos analisados; <sup>2</sup> A – número total de alelos; <sup>3</sup> N<sub>p</sub> – número de alelos privados; <sup>4</sup> R<sub>A</sub> – riqueza alélica; <sup>5</sup> N<sub>A</sub> – número médio de alelos; <sup>6</sup> N<sub>E</sub> – número de alelos efetivos; <sup>7</sup> H<sub>o</sub> – heterozigosidade observada; <sup>8</sup> H<sub>e</sub> – heterozigosidade esperada; <sup>9</sup> F<sub>IS</sub> – índice de endogamia; <sup>10</sup> HWE<sup>EUS</sup> – Equilíbrio de Hardy-Weinberg; <sup>11</sup> \* – valor significativo para o coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>); <sup>11</sup> \*\* – número de locos com desvio EHW.

### 2.3.2.2 Estrutura genética e fluxo gênico

As análises de possíveis sinais de gargalo genético indicaram excessos de heterozigiosidade (sinal de *bottleneck*) no teste de Wilcoxon para dez populações pelo modelo IAM (Ser.PR, Ara.PR/13, SA.PR, PP.SP/13, SH.GO, Ara.PR/14, Lon.PR, Ita.RS, Gua.PR e SD.BA), sete pelo modelo TPM (Igu.PR, Ser.PR, Ara.PR/13, SA.PR, War.PR, PP.SP/13 e Lon.PR) e duas pelo modelo SMM (Igu.PR e Ara.PR/13) (TABELA 2.3). Todas as populações tiveram uma distribuição normal (L-shaped), indício de ausência de gargalo genético, para a frequência dos alelos no shift model test.

TABELA 2.4 – TESTE DE GARGALOS GENÉTICOS RECENTES (BOTTLENECK) PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE *E. heros*. TESTE DE WILCOXON SIGN-RANK PARA EXCESSO DE HETEROZIGOSIDADE E TESTE MODE-SHIFT PARA PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS.

AMOSTRAS	WILCOXON SIGN-RANK							DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS
	N <sup>1</sup>	IAM <sup>2</sup>		TPM <sup>3</sup>		SMM <sup>4</sup>		
	H <sub>E</sub> <sup>5</sup> /H <sub>D</sub> <sup>6</sup>	P	H <sub>E</sub> /H <sub>D</sub>	P	H <sub>E</sub> /H <sub>D</sub>	P		
BV.PR	15	6/2	0,230	6/2	0,125	6/2	0,156	L-shaped <sup>8</sup>
Igu.PR	13	6/2	0,191	6/2	0,010*	6/2	0,010*	L-shaped
Ser.PR	15	6/2	0,014 <sup>*7</sup>	6/2	0,020*	5/3	0,273	L-shaped
CM.SP	15	5/3	0,230	4/4	0,422	3/5	0,629	L-shaped
Ara.PR/13	14	6/1	0,008*	6/1	0,027*	6/1	0,039*	L-shaped
SA.PR	14	7/1	0,010*	6/2	0,013*	6/2	0,125	L-shaped
War.PR	14	6/2	0,125	6/2	0,037*	4/4	0,578	L-shaped
Nan.SP	14	5/3	0,156	6/2	0,273	5/3	0,527	L-shaped
PP.SP/13	15	6/1	0,008*	6/1	0,012*	6/1	0,123	L-shaped
PP.SP/14	15	3/5	0,727	4/4	0,844	3/5	0,980	L-shaped
SH.GO	15	6/2	0,027*	6/2	0,125	5/3	0,273	L-shaped
Ara.PR/14	14	7/1	0,014*	6/2	0,156	5/3	0,422	L-shaped
Lon.PR	15	7/1	0,027*	7/1	0,006*	5/3	0,230	L-shaped
Ita.RS	15	7/1	0,006*	4/4	0,230	3/5	0,726	L-shaped
Gua.PR	15	6/2	0,010*	6/2	0,125	2/6	0,727	L-shaped
SD.BA	15	6/2	0,020*	4/4	0,156	4/4	0,770	L-shaped
So.MT	10	6/2	0,230	6/2	0,125	6/2	0,230	L-shaped

<sup>1</sup>N – número de indivíduos analisados; <sup>2</sup>IAM – Infinite Allele Model; <sup>3</sup>TPM – Two Phase Model (70% SSM), <sup>4</sup>SMM – Stepwise Mutation Model; <sup>5</sup>H<sub>E</sub> – número de locos mostrando excesso de heterozigiosidade; <sup>6</sup>H<sub>D</sub> – número de locos mostrando deficiência de heterozigiosidade; <sup>7</sup>\* – valores significativos para os testes Sign/Wilcoxon sign-rank ( $P \leq 0,05$ ) e significativo para excesso de heterozigiosidade; <sup>8</sup> L-shaped – distribuição normal = ausência de gargalo genético.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a maior parte da variação ocorre dentro de populações (99,09%), enquanto apenas 0,99% da variação está entre elas (TABELA 2.5).

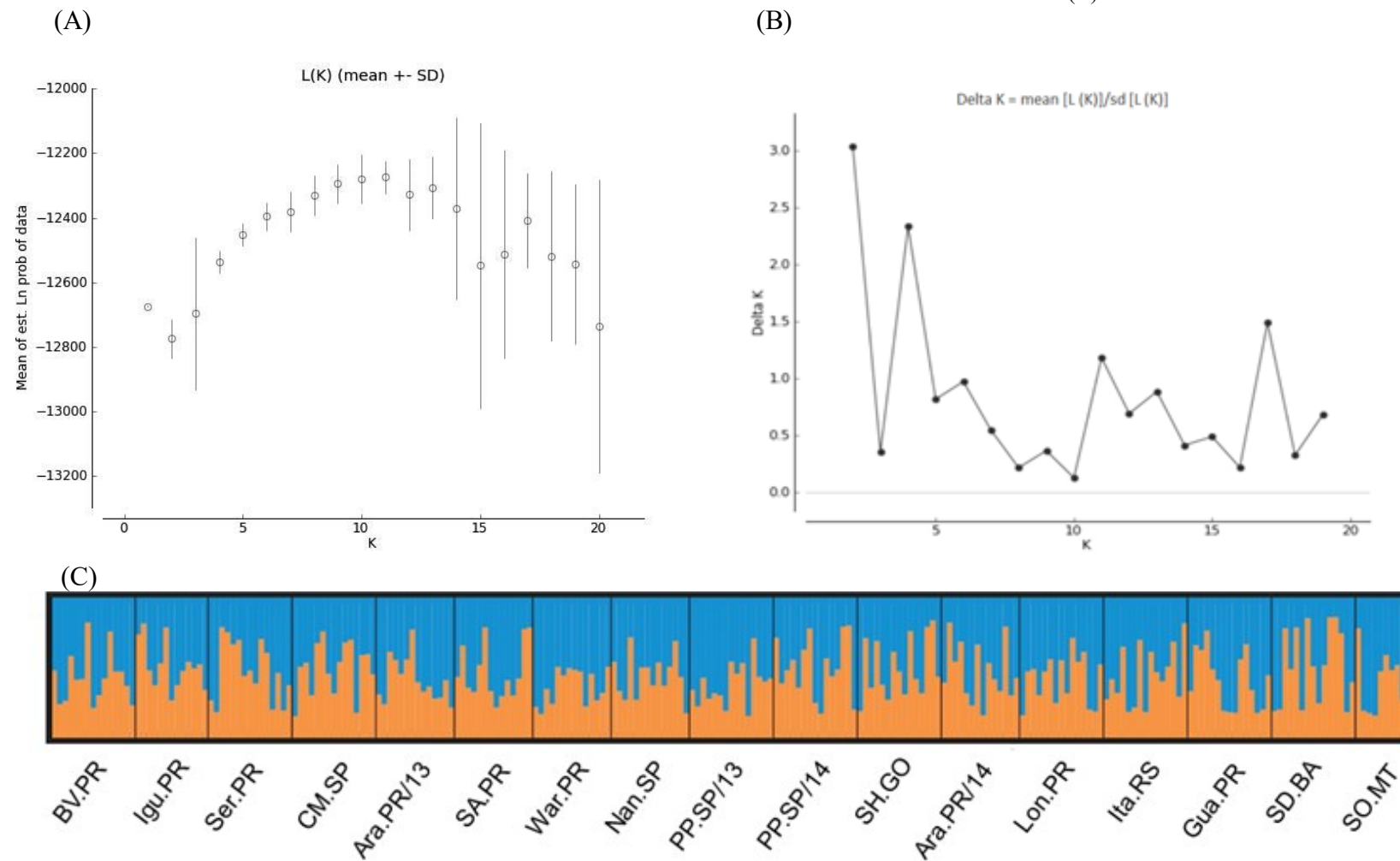
TABELA 2.5 – ANÁLISE DA VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE *E. heros*, ANALISADAS COM BASE EM OITO LOCOS MICROSSATÉLITES, MOSTRANDO A PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO ENTRE OS INDIVÍDUOS, POPULAÇÕES E DENTRO DAS POPULAÇÕES. ÍNDICE  $\Phi_{ST}$  – DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE POPULAÇÕES.

FONTE DE VARIAÇÃO	PORCENTAGEM DE VARIAÇÃO
Entre populações	0,91
Dentro de populações	99,09
Índice de fixação	$\Phi_{ST}$ – 0,009

$P < 0,05$  (TESTE DE SIGNIFICÂNCIA USANDO 10100 PERMUTAÇÕES).

A análise de agrupamentos Bayesianos realizada pelo programa Structure, indicou que o valor mais provável de  $K$  (número de agrupamentos), a partir de  $L(K)$  e  $\Delta K$  foi  $K = 2$  (FIGURA 3.2 a e b). A representação gráfica desta análise mostrou que não existem grupos bem definidos entre os indivíduos analisados e as ancestralidades estimadas parecem distribuir-se de modo similar (FIGURA 3.2 c).

FIGURA 2.2 – (A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DADOS PARA ESTIMAR O NÚMERO DE  $K$  ( $K=2$ ); (B) BASEADO NO VALOR DE  $\Delta K$  (EVANNO *et al.*, 2005) E DA MÉDIA DE LIKELIHOOD  $L(K)$ ; (C) STRUCTURE BAR REPRESENTANDO OS RESULTADOS DA ANÁLISE BAYESIANA PARA 17 PONTOS DE AMOSTRAGEM DE *E. heros*; CADA COLUNA REPRESENTA UM INDIVÍDUO E AS CORES (AZUL E LARANJA) INDICAM À PROPORÇÃO RELATIVA DO GENOMA DE CADA INDIVÍDUO PERTENCER A UM DOS CLUSTERS ( $K$ ).



As estimativas de diferenciação populacional par a par ( $\Phi_{ST}$ ) indicaram ausência de estrutura genética na maioria dos pontos amostrados, com exceção para a amostra de SD.BA que se mostrou uma estruturação genética baixa com a maioria dos demais pontos avaliados, com valores de  $\Phi_{ST}$  variando de 0,031 a 0,063 (TABELA 2.6).

Altos níveis de fluxo gênico foram estimados entre as amostras estudadas (Migrate-N). A maior estimativa de migrantes por geração (estimativa  $M \times \Theta$ ) foi obtida para movimentos de Arapoti, ARA.PR/13 para Sertaneja, SER.PR (42,48 migrantes por geração) e para Warta, WAR.PR (40,36), enquanto que as menores estimativas foram obtidas de São Desidério SD.BA para os locais remanescentes (TABELA 2.7).

TABELA 2.6 – DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA PAR A PAR  $\Phi_{ST}$  PARA DADOS DE MICROSSATÉLITES. OBTIDA PARA AMOSTRAS DE *E. heros* DOS PRINCIPAIS ESTADOS PRODUTORES DE SOJA DO BRASIL (PARÂMETRO BASEADO NAS ESTATÍSTICAS F DE WRIGHT, (WRIGHT, 1965)).

Amostras/ Código	BV.PR	Igu.PR	Ser.PR	CM.SP	Ara.PR/13	SA.PR	War.PR	Nan.SP	PP.SP/13	PP.SP/14	SH.GO	Ara.PR/14	Lon.PR	Ita.RS	Gua.PR	SD.BA	BV.PR
BV.PR																	
Igu.PR	0																
Ser.PR	0	0															
CM.SP	0,003	0	0														
Ara.PR/13	0,004	0,001	0,006	0,001													
SA.PR	0,002	0	0	0,004	0,004												
War.PR	0,003	0,002	0,000	0,001	0	0,007											
Nan.SP	0,002	0,005	0,009	0,007	0,000	0,014	0,005										
PP.SP/13	0	0	0	0	0	0,001	0	0,004									
PP.SP/14	0,003	0	0,012	0,012	0,003	0,014	0,010	0	0,001								
SH.GO	0,009	0	0,002	0,005	0,005	0,009	0,009	0,021	0	0,013							
Ara.PR/14	0,006	0,001	0,001	0,007	0,010	0,007	0,007	0,015	0,005	0,011	0,007						
Lon.PR	0	0	0,000	0,011	0,005	0,006	0,009	0,000	0,005	0,006	0,015	0,011					
Ita.RS	0,008	0,000	0,002	0,009	0,005	0,009	0,003	0,007	0,000	0,014	0,007	0,009	0,014				
Gua.PR	0	0	0,000	0,000	0,007	0,008	0,009	0,009	0	0,011	0,008	0,001	0,011	0,003			
SD.BA	0,039 <sup>1</sup>	0,038*	0,031*	0,045*	0,038*	0,042*	0,054*	0,063*	0,033*	0,058*	0,019	0,033*	0,049*	0,038*	0,035*		
So.MT	0,011	0	0,005	0,006	0,008	0,007	0,014	0,018	0,004	0,016	0,008	0,007	0,010	0,015	0,007	0,039*	

<sup>1</sup>\* –  $P < 0,01$  (teste de significância usando 1023 permutações).

TABELA 2.7 – TAMANHO POPULACIONAL EFETIVO ( $\Theta$ ) E FLUXO GÊNICO ENTRE AS POPULAÇÕES DE *E. heros*, ESTIMADOS A PARTIR DO PROGRAMA MIGRATE-N. MIGRAÇÃO ESTIMADA A PARTIR DO ÍNDICE M ( $M = m/\mu$ ) MULTIPLICADO PELO  $\Theta$ .

Amostras/	M x $\Theta$ – Estimativa de imigrantes por geração																	
Código	$\Theta$	BV.PR	Igu.PR	Ser.PR	CM.SP	Ara.PR/13	SA.PR	War.PR	Nan.SP	PP.SP/13	PP.SP/14	SH.GO	Ara.PR/14	Lon.PR	Ita.RS	Gua.PR	SD.BA	So.MT
BV.PR	0,86		8,43	14,29	5,21	8,89	12,18	16,21	11,47	19,15	24,63	8,30	20,42	13,73	8,58	14,25	6,35	14,72
Igu.PR	1,12	9,96		14,88	13,71	13,40	19,02	16,95	9,69	12,62	15,04	17,38	17,07	30,66	9,61	13,52	8,55	7,34
Ser.PR	0,51	9,80	7,22		6,81	11,50	4,45	17,15	11,85	7,20	11,06	12,81	8,53	7,18	4,98	9,23	5,35	7,35
CM.SP	1,03	7,73	16,18	13,61		10,19	8,70	19,60	14,35	9,45	11,71	11,12	8,00	8,78	11,04	11,19	3,46	10,15
Ara.PR/13	1,52	20,71	17,85	42,48	14,72		21,45	40,36	21,66	16,90	26,11	26,06	16,47	31,62	16,26	25,69	6,41	22,83
SA.PR	0,85	7,62	11,61	5,79	8,39	12,44		9,51	6,59	7,36	9,39	7,62	10,22	9,66	5,91	11,55	3,46	5,35
War.PR	1,11	20,68	15,20	38,75	19,92	36,69	16,43		20,85	31,63	27,67	27,04	13,39	20,22	13,18	12,30	10,19	18,45
Nan.SP	0,98	15,44	10,13	18,47	12,45	12,18	9,39	16,38		21,16	21,50	10,63	10,90	18,84	13,09	11,27	4,88	20,52
PP.SP/13	0,82	22,22	11,08	10,50	7,94	6,94	9,53	18,47	20,85		13,12	8,86	10,32	10,87	9,47	11,66	4,81	7,70
PP.SP/14	0,85	24,11	14,70	17,41	13,16	12,69	9,31	27,39	20,16	16,67		24,14	17,44	19,35	12,12	10,25	9,58	8,87
SH.GO	0,93	10,08	15,66	19,25	8,90	19,72	6,26	22,06	7,58	13,09	20,30		10,76	14,21	9,88	13,77	11,67	11,54
Ara.PR/14	0,30	10,45	5,65	9,33	2,54	5,79	4,27	3,18	3,31	3,91	5,56	2,78		2,57	3,22	5,58	2,68	3,11
Lon.PR	0,45	8,85	12,08	7,65	4,90	10,95	3,69	9,44	11,89	6,53	8,78	7,39	4,43		10,58	11,16	3,15	3,80
Ita.RS	0,73	4,74	8,38	8,84	6,98	10,13	4,85	13,41	7,75	9,39	8,79	10,29	4,60	14,95		6,54	2,66	7,04
Gua.PR	0,40	5,22	3,79	10,69	4,97	7,30	5,05	6,42	7,33	4,42	7,25	6,57	7,22	8,43	3,44		6,09	4,52
SD.BA	0,07	0,45	1,22	0,68	0,38	0,87	0,55	0,50	0,62	0,46	1,20	1,01	0,75	0,74	0,59	1,02		0,77
So.MT	1,38	18,25	7,29	18,51	13,60	18,29	6,18	10,36	28,65	9,34	19,36	10,36	17,06	9,68	10,66	12,24	4,35	

## 2.4 DISCUSSÃO

De um modo geral, os resultados obtidos revelaram uma elevada variabilidade genética e uma baixa estruturação entre as populações de *E. heros* estudadas. A população BA-1, coletada no estado da Bahia, na região nordeste do Brasil, revelou-se como a única exceção para o padrão de ausência de diferenciação genética entre as amostras analisadas. Chama atenção também o fato de que a população BA-1 esteve entre aquelas que mostraram os menores níveis de diversidade genética, apresentando os menores valores de riqueza alélica ( $R_A$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e alelos efetivos ( $N_E$ ).

No presente estudo foram desenvolvidos e caracterizados os primeiros marcadores microssatélites para *E. heros*. Os oito locos utilizados neste trabalho, mostraram-se altamente informativos, devido aos altos valores obtidos de conteúdo de informação polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.*, (1980), e com uma elevada probabilidade combinada de exclusão de paternidade e uma baixa probabilidade combinada de identidade gênica. Além disso, apresentaram bons padrões de amplificação, alelos bem definidos e ausência de desequilíbrio de ligação. Assim fica evidente o alto potencial desses marcadores para análise da estrutura e diversidade de *E. heros*, possibilitando informações fundamentais para a compreensão do potencial adaptativo e evolutivo da espécie (FRANKHAM *et al.*, 2010), incluindo ações que visem o manejo integrado de suas populações.

Altos níveis de diversidade genética foram obtidos para as 17 amostras de *E. heros*, coletadas ao longo do território brasileiro. Resultados semelhantes já haviam sido reportados para esta espécie usando marcadores RAPD (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2004). De um modo geral, vários trabalhos com insetos pragas têm mostrado elevados níveis de diversidade genética nas populações estudadas (FONTES *et al.*, 2012; DYCKEY *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2015), sugerindo que este possa ser um padrão para tal grupo de insetos. De fato, os níveis de diversidade obtidos no presente estudo foram acima do relatado para loci de microssatélites de espécies pragas em culturas da região neotropical ou de outras regiões do planeta (DOMINGUES *et al.*, 2012; KIRK *et al.*, 2013; FONTES *et al.*, 2012; PAVINATO *et al.*, 2012). De modo particular, algumas dessas espécies foram introduzidas na região neotropical, provenientes de regiões como a Ásia (*Grapholita molesta*, Busk, 1916) (KIRK *et al.*, 2013), e possivelmente não trouxeram toda a diversidade genética de seus centros de origem, representando apenas parte dos alelos que existiam na população original. Por outro lado, como o centro de origem de *E. heros* é a região neotropical (PANIZZI; SLANSKY JR 1985), toda a



sua diversidade genética possivelmente distribuiu-se ao longo dos territórios brasileiros a partir do momento que as condições ideais foram fornecidas para a expansão e avanço da cultura da soja em diversas fronteiras agrícolas.

Adicionalmente, o rápido e intenso avanço da distribuição das áreas de cultivo de soja também pode ter relação com sinais de gargalos genéticos obtidos em grande parte das amostras analisadas. Como esta análise responde a sinais de reduções recentes no tamanho efetivo populacional (CORNUET; LUIKART, 1996) e expansão das áreas de soja ainda é em processo contemporâneo (BUENO *et al.*, 2012), esses resultados sugerem a influência da disseminação da espécie para novas áreas a partir de pequenos grupos, ou seja, efeito fundador (SUN *et al.*, 2012).

Reconhecidamente, níveis elevados de diversidade genética possibilitam a seleção de genótipos resistentes e adaptados às alterações ambientais (RUBIANO-RODRIGUEZ *et al.*, 2014), como por exemplo, a pressão realizada pela constante aplicação de inseticidas, assim como do aumento de suas doses. Embora os marcadores utilizados no presente estudo sejam seletivamente neutros, a amostra de Pedrinhas Paulista/SP-2013, que apresentou os maiores índices de diversidade em relação às demais amostras, sugere alguma relação entre os níveis de diversidade genética e a resistência, visto que esta região tem exibido um longo histórico de problemas com inseticidas, principalmente organofosforados (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2001; SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2009). Outros estudos genéticos com outras pragas também sugerem essa relação (DOMINGUES *et al.*, 2012; KIRK *et al.*, 2013). A partir disso, é importante considerar que em alguns casos, locos de microssatélites podem estar ligados a genes selecionáveis (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Contudo, outros fatores como o fluxo gênico também são comumente considerados para a evolução dessa resistência (CAPRIO; TABASHNIK, 1992).

Os elevados níveis de fluxo gênico e ausência de diferenciação genética foram obtidos entre a maior parte das amostras analisadas, exceto SD.BA que se diferenciou das demais. Esses dados também foram corroborados pela análise de agrupamento bayesianos, e pela reduzida variação molecular (<1%) entre os indivíduos provenientes dos diferentes locais. Apesar da falta de estrutura genética, tais resultados parecem coerentes, principalmente quando se considera a ampla distribuição geográfica dessa espécie ao longo do território brasileiro, influenciada pela expansão das áreas de produção de soja, e a abundância dessa praga no período de safra. De fato, altos níveis de fluxo gênico e grandes tamanhos populacionais, como

é sugerido para *E. heros*, são características determinantes para a manutenção de elevados níveis de diversidade genética e ausência de diferenciação populacional (FREELAND, 2005).

Por outro lado, estudos prévios reportam uma baixa capacidade de dispersão dos percevejos pragas, tais como, *Piezodorus guildinii*, *Nezara viridula* e também *E. heros* (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2004; COSTA E LINK, 1982). Além disso, estudos genéticos previamente realizados para *E. heros* com marcadores RAPD (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 2004) mostraram altos níveis de diferenciação genética para populações de *E. heros* dentro da mesma área de distribuição. Dois fatores poderiam ser considerados para a diferença entre esses dados e o presente estudo. Primeiro, desde a realização do trabalho de SOSA-GÓMEZ *et al.*, (2004) até o presente momento (10 anos), apesar da reduzida capacidade de dispersão da espécie, tem sido observadas alterações de cenário, tais como a expansão da área de soja, intensificação do transporte de grandes volumes de soja com a presença de *E. heros*, e condições climáticas para desenvolvimento favoráveis que se traduzem em densidades populacionais elevadas, e provavelmente um maior número de gerações ocasionado pelo aquecimento global, tal como observado em *Nezara viridula* (KIRITANI, 2007). Segundo, marcadores RAPD não são totalmente neutros, incluindo muitas vezes algumas regiões selecionáveis (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), o que é bem mais raro para SSRs (WILLIAMS *et al.*, 1990; KASHI *et al.*, 1997). Assim, considerando as intensas mudanças do agroecossistema que esta espécie tem sofrido, algumas diferenças genéticas poderiam ser obtidas por marcadores RAPD e não por SSRs.

Considerando a revolução verde iniciada durante a década de 1970, e que *E. heros* tem sido uma praga chave para a cultura da soja há pouco mais de 20 anos (PANIZZII; ROSSI, 1991), reduzida diferenciação genética pode ser explicada pela disseminação da espécie a partir de um ponto de origem, sem o tempo suficiente para haver estrutura genética. Isso pelo menos no que se refere as informações obtidas para marcadores microssatélites. De fato, isto teria grandes contribuições nas altas estimativas encontradas de fluxo gênico.

Embora quase todos os valores de  $\Phi_{ST}$  par a par não tenham sido significativos, os dados de estrutura genética, indicam a amostra de SD.BA como uma população distinta.

## 2.5 CONCLUSÃO

O estudo indicou que não houve estruturação genética em *E. heros*, entre as diferentes de áreas produtoras de soja no Brasil, entretanto, mostrou altos níveis de diversidade genética para a espécie e estimativas elevadas de fluxo gênico. De fato, os dados obtidos no presente estudo fornecem informações de grande relevância na compreensão de aspectos relacionados a biologia e a distribuição genética de *E. heros* na região neotropical. Assim, tais informações podem contribuir para o melhor conhecimento da espécie e principalmente para futuras ações que visem o manejo integrado de pragas (MIP).

## 2.6 REFERÊNCIAS

- BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, v. 185, p. 313-326, 2010.
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BUENO, A. F. *et al.* Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B. *et al.* Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, p. 37-74, 2012.
- BUSATO, G. R. *et al.* Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.
- CAPRIO, M. A.; TABASHNIK, B. E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 611-620, 1992.
- CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. Comparative. **Biochemistry and Physiology**, v.126, p.455-476, 2000.
- CHAPUIS, M. P. *et al.* Challenges to assessing connectivity between massive populations of the Australian plague locust. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 278, n. 1721, p. 3152-3160, 2011.
- CHEN, M. H.; DORN, S. Cross-amplification of microsatellites from the codling moth *Cydia pomonella* to three other species of the tribe Grapholitini (Lepidoptera: Tortricidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 1034-1037, 2010.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- COSTA, E. C.; D. LINK. Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. **Revista Centro Ciências Rurais**, v. 12, p. 51-57, 1982.
- DOMINGUES, F. A. *et al.* Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 2136-2146, 2012.
- EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-36, 2012.

EDWARDS, K.J. *et al.* Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechniques**, v.20, n.5, p.758-760, 1996.

EVANNO, G. *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564 - 567, 2010.

FONTES, F. H. M. *et al.* Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia agricola**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2012.

FRANKHAM R. *et al.* **Introduction to conservation genetics**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

FREELAND J. R. **Molecular Ecology**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

FUXA, J. E. *et al.* Prevalence of a trypanosomatid in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. **J. Eukaryot. Microbiol.** 47: 388-394, 2000.

GIANGARELLI, D. C. *et al.* Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators. **Apidologie (Celle)**, v. 1, p. 1-12, 2015.

GONZÁLEZ, C. *et al.* Development and Characterization of Microsatellite Loci in the Mistletoe *Psittacanthus Schiedeianus* (Loranthaceae). **Applications in Plant Sciences** 3.1, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298235/>>. Acesso em 20/01/2016.

GOUDET J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3, 2001. Disponível em: <[www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html)>. Acesso em 20/01/2016.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

IBGE, 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Geociências. Rio de Janeiro: IBGE; 2014. Disponível em: [http://downloads.ibge.gov.br/downloads\\_geociencias.htm](http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm). Acesso em 20/01/2016.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801-1806, 2007.

KASHI Y. *et al.* Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genet.**, v. 13, p. 74-78, 1997.

KIRITANI, K. The impact of global warming and land-use change on the pest status of rice and fruit bugs (Heteroptera) in Japan. **View issue TOC**. Volume 13, Issue 8 Pages 1586-1595, 2007.

KIRK, H. *et al.* Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **BMC Ecology**, v.13, n. 12, 2013.

LETELIER, L. *et al.* Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in soapbark, *Quillaja saponaria* (Quillajaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 3, n. 5, 2015.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v. 12, p. 228-237, 1998.

LUIKART, G. *et al.* Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 238-247, 1998.

MARSHALL, T. C. *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

MEDEIROS, L.; MEGIER, G. A. Occurrence and performance of *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on alternative host plants in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 459-463, 2009.

MILLER, M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Ver. 1.3, 1997. Disponível em: <<http://bioweb.usu.edu/mpmbio>>. Acesso em 20/01/2016.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

PANIZZI, A. R.; ROSSI, C. E. The role of *Acanthospermum hispidum* in the phenology of *Euschistus heros* and of *Nezara viridula*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 59, p. 67-74, 1991.

PANIZZI, A.R.; SLANSKY JR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, p. 184-214, 1985.

PAVINATO, V. A. *et al.* Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and molecular research**, v. 12, n. 1, p. 370-380, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

- PIRY, S. *et al.* BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.
- PRITCHARD J. K. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, 945-959, 2000.
- PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for STRUCTURE software**. Chicago: The University of Chicago Press, 2004.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, M. Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues, p.1-10. In: S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort (eds.), **Plant molecular biology manual**, v. A6, Dordrecht, Belgium, Kluwer Academic Publisher, 1988. 1032p.
- ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 4, p. 137-138, 2004.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, p. 365-386, 2000.
- RUBIANO-RODRIGUEZ, J. A. *et al.* Genetic diversity and insecticide resistance during the growing season in the green peach aphid (Hemiptera: Aphididae) on primary and secondary hosts: a farm-scale study in Central Chile. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-13, 2014.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 223-234, 2000.
- SILVA, V. P. da. *et al.* Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.11, p.844-852, 2014.
- SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 7-17, 2015.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 378-384, 2004.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Entomopathogens associated with soybean/wheat production systems in Brazil and Argentina. In: **SIP 35th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology**, Foz do Iguaçu, p. 75, 2002.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, n. 2 p.317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.1209-1216, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Journal of Insect Science**, v. 5, n. 23, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO *et al.* **Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, p. 673-723, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.7, p.767-769, 2010.

SUN, J. T. *et al.* Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **BMC Genetics**, v. 13, v. 8. 2012.

SUN, W. *et al.* genetic variation and geographic differentiation among populations of the nonmigratory agricultural pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 150, 2015.

TANG, X. T. *et al.* Microsatellite-based analysis of the genetic structure and diversity of *Aleurocanthus spiniferus* (Hemiptera: Aleyrodidae) from tea plants in China. **Gene**, v. 560, n.1, p.107-113, 2015.

VALLE, G. E., *et al.* Population variability of *Bemisia tabaci* (Genn.) in different hosts. **Genetics and Molecular Research**, n. 4, p. 4615-24, 2013.

VALLONE, P. M. BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VAN OOSTERHOUT, C. V. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 535-538, 2004.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna, 1999. Disponível em: <<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>>. Acesso em 20/01/2016.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.



## REFERÊNCIA GERAL

- ADELMAN, Z.N. *et al.* Deep sequencing of pyrethroid resistant bed bugs reveals multiple mechanisms of resistance within a single population. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.
- ALIZADEH, M. *et al.* Evaluation of insecticide resistance and biochemical mechanism in two populations of *Eurygaster integriceps* Puton (Heteroptera: Scutelleridae). **Munis Entomology & Zoology Journal**, v. 5, n. 2 p. 734 – 744, 2010.
- ALOUT, H. *et al.* A new aminoacid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 41-47, 2007.
- BARROS, R.; DEGRANDE, P. E. Desempenho do algodão-Bt como tática de controle de pragas em condições de campo. **Científica**, v.40, n.2, p.117 – 137, 2012.
- BASS, C. *et al.* Genomic resources for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Transcriptome pyrosequencing and microarray design, **Insect Science**, v. 19, p. 1-12, 2012.
- BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, v. 185, p. 313-326, 2010.
- BECKEL, H. dos S. *et al.* Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 110-114, 2006.
- BOCQUENE, G.; GALGANI, F. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. **ICES Techniques in Marine Environmental Sciences**, n. 22, p 1-12, 1998.
- BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BOUVIER, J. C. *et al.* Enzymatic diagnosis of resistance to deltamethrin in diapausing larvae of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 55-64, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Metodologia para quantificação de atividade de enzimas relacionadas a resistência a inseticidas em *Aedes aegypti***. 1 ed. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. IBAMA, Comunicado. Diário Oficial da União – Seção 3. P. 112. N.º139. 19 de jul. 2012. ISSN 1677-7069.

- BUENO, A. F. *et al.* Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B. *et al.* Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, p. 37-74, 2012.
- BURR, I.W.; FOSTER, L.A. **A test for equality of variances.** (Mimeo Series, 282) West Lafayette: University of Purdue, 1972.
- BUSATO, G. R. *et al.* Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.
- BUSH, M.R. *et al.* Azinphosmethyl resistance in the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae): reversion, diagnostic concentrations, associated esterases, and glutathione transferases. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 213-225, 1993.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos, oitavo levantamento, safra 2014/2015, v. 2, n. 8, 2015. 122p.
- CAPRIO, M. A.; TABASHNIK, B. E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 611-620, 1992.
- CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. Comparative. **Biochemistry and Physiology**, v.126, p.455-476, 2000.
- CHAPUIS, M. P. *et al.* Challenges to assessing connectivity between massive populations of the Australian plague locust. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, v. 278, n. 1721, p. 3152-3160, 2011.
- CHEN, M. H.; DORN, S. Cross-amplification of microsatellites from the codling moth *Cydia pomonella* to three other species of the tribe Grapholitini (Lepidoptera: Tortricidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 1034-1037, 2010.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S. *et al.* **Práticas de manejo de pragas utilizadas na soja e seu impacto sobre a cultura.** Londrina: Embrapa Soja, 16p. (Embrapa Soja: Circular Técnica, 78), 2010.
- CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. **Percevejos da soja e seu manejo.** Londrina: Embrapa Soja, 1999.
- CORSEUIL, E. *et al.* **Insetos nocivos a soja no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: UFRGS – Faculdade de Agronomia, 1974.
- COSTA, E. C.; D. LINK. Dispersão de adultos de *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) em soja. **Revista Centro Ciências Rurais**, v. 12, p. 51-57, 1982.

DEPIERI, R. A.; PANIZZU, A. R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n.2, p. 197-203, 2011.

DOMINGUES, F. A. *et al.* Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 2136-2146, 2012.

EARL, D. A.; VON HOLDT, B. M. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-36, 2012.

EDWARDS, K.J. *et al.* Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. **Biotechniques**, v.20, n.5, p.758-760, 1996.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EVANNO, G. *et al.* Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564 - 567, 2010.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, v. 82, n. 3, p. 83-90, 1995.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. *et al.* The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, p. 163-170, 2004.

FITT, G. P. *et al.* Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. IN: HILBECK, A. ANDOW, D.A e FONTES, E.M.G. (Eds.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006, p. 300-345.

FONTES, F. H. M. *et al.* Structure of genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations in Brazilian crops and locations. **Scientia agricola**, v. 69, n. 1, p. 47-53, 2012.

FRANKHAM R. *et al.* **Introduction to conservation genetics**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

FREELAND J. R. **Molecular Ecology**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

FUXA, J. E. *et al.* Prevalence of a trypanosomatid in the southern green stink bug, *Nezara viridula*. **J. Eukaryot. Microbiol.** 47: 388-394, 2000.

GARIEPY, T. D., *et al.* Occurrence, genetic diversity, and potential pathways of entry of *Halyomorpha halys* in newly invaded areas of Canada and Switzerland. *Journal of Pest Science*, v. 87, p. 17–28, 2014.

GIANGARELLI, D. C. *et al.* Orchid bees: a new assessment on the rarity of diploid males in populations of this group of Neotropical pollinators. **Apidologie (Celle)**, v. 1, p. 1-12, 2015.

GONZÁLEZ, C. *et al.* Development and Characterization of Microsatellite Loci in the Mistletoe *Psittacanthus Schiedeana* (Loranthaceae). **Applications in Plant Sciences** 3.1, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298235/>>. Acesso em 20/01/2016.

GOUDET J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3, 2001. Disponível em: <[www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html)>. Acesso em 20/01/2016.

GREENE, J. K.; CAPPS, C. Laboratory evaluations of cotton insecticides for control of stink bugs. **Summaries of Arkansas Cotton Research**, 2001, p. 202-209, 2001.

GUNNING, R. V.; MOORES, G. D. Insensitive acetylcholinesterase as sites for resistance to organophosphat and carbamat in insect: In: ISHAAYA, I. (ed.). **Biochemical Site of Insecticide Action and Resistance**. Berlin Heidelberg, Springer B Verlag, 2001. p. 221-238.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1009-1015, 2000.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brown wheat mite, **Journal of Economic Entomology**, v.48, p.157-161, 1955.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. *et al.* **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

HOPKINS, B.W. *et al.* Species composition, damage potential, and insecticide susceptibility of stink bugs in cotton in the Lower Gulf Coast region of Texas. **Southwestern Entomology**, v. 35, n.19, p. 32, 2010.

HUSCH, P. E. *et al.* Characterization of injury caused by *Edessa meditabunda* (F.), *Chinavia impicticornis* (Stål), and *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pentatomidae) to soybean. **Neotropical Entomology**, v. 43, p. 276–281, 2014a.

HUSCH, P. E. *et al.* Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Euschistus heros* a tiametoxam+lambda-cialotrina e acefato. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 34., 2014, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja. p. 78-79, 2014b.

IBGE, 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Geociências. Rio de Janeiro: IBGE; 2014. Disponível em: [http://downloads.ibge.gov.br/downloads\\_geociencias.htm](http://downloads.ibge.gov.br/downloads_geociencias.htm). Acesso em 20/01/2016.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801-1806, 2007.

JONES, C. M. *et al.* Age-specific expression of a P450 monooxygenase (CYP6CM1) correlates with neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, p. 53-58, 2011.

KASHI Y. *et al.* Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends Genet.**, v. 13, p. 74-78, 1997.

KAVAR, T. *et al.* Genetic differentiation of geographically separated populations of the Southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, p. 117–128, 2006.

KEEN, J. H. *et al.* Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. **Journal Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KIRITANI, K. The impact of global warming and land-use change on the pest status of rice and fruit bugs (Heteroptera) in Japan. **View issue TOC**. Volume 13, Issue 8Pages 1586-1595, 2007.

KIRK, H. *et al.* Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **BMC Ecology**, v.13, n. 12, 2013.

LETELIER, L. *et al.* Isolation and characterization of 12 microsatellite loci in soapbark, *Quillaja saponaria* (Quillajaceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 3, n. 5, 2015.

LI, H. *et al.* Effect of temperature on toxicity of pyrethroids and endosulfan, activity of mitochondrial Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>-Mg<sub>2</sub><sup>+</sup>-ATPase in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 151-156, 2006.

LEORA SOFTWARE. **POLO-Plus 1.0 Probit and Logit analysis**. Petaluma, California. 2003.

LÓPEZ, J. E. *et al.* Toxicity to adult brown stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) in a glass-vial bioassay of selected insecticide mixtures. *Southwestern Entomologist*, v. 37, n. 4, p. 459-466, 2012.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v. 12, p. 228-237, 1998.

LUIKART, G. *et al.* Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 238-247, 1998.

MARKUSSEN, M. D. K.; KRISTENSEN, M. Cytochrome P450 monooxygenase mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 50-58, 2010.

MARSHALL, T. C. *et al.* Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 639-655, 1998.

MEDEIROS, L.; MEGIER, G. A. Occurrence and performance of *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) on alternative host plants in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 459-463, 2009.

MILLER, M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Ver. 1.3, 1997. Disponível em: <<http://bioweb.usu.edu/mpmbio>>. Acesso em 20/01/2016.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no Norte do Paraná. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 205-218, 2000.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.294-307, 2006.

OMER, A.D. *et al.* Sweetpotato whitefly resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation is related to insecticides use. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 67, p. 173-182, 1993.

PANIZZI, A. R. *et al.* Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood 1837) no rendimento e qualidade da soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA SOJA, 1, 1979, Londrina, **Anais...**, Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1979, p. 59-78.

PANIZZI, A.R.; NIVA, C.C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 509-511, 1994.

PANIZZI, A. R.; OLIVEIRA, E. D. M. Performance and seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* nymphs and adults on a novel food plant (Pigeonpea) and soybean. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 88, p. 169-175, 1998.

PANIZZI, A. R.; ROSSI, C. E. The role of *Acanthospermum hispidum* in the phenology of *Euschistus heros* and of *Nezara viridula*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 59, p. 67-74, 1991.

PANIZZI, A.R.; SLANSKY JR, F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, p. 184-214, 1985.

PARENTE, R. C. P. **Aspectos da análise de resíduos**. 139f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1984.

PAVINATO, V. A. *et al.* Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and molecular research**, v. 12, n. 1, p. 370-380, 2012.

PICOLLO, M. I. *et al.* High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern Argentina. **Journal of Medical Entomology**, n. 42, p. 637-642, 2005.

PUINEAN, A. M. *et al.* Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 6, p. 1-11, 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PIRY, S. *et al.* BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PRITCHARD J. K. *et al.* Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, 945-959, 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. **Documentation for STRUCTURE software**. Chicago: The University of Chicago Press, 2004.

RAMPELOTTI, F. T. Diversidade Genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, Usando Marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 20-29, 2008.

RAYMOND, M.; ROUSSET, M. Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues, p.1-10. In: S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort (eds.), **Plant molecular biology manual**, v. A6, Dordrecht, Belgium, Kluwer Academic Publisher, 1988. 1032p.

ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 4, p. 137-138, 2004.

ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**, v.79, p.293-298, 1986.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press, p. 365-386, 2000.

RUBIANO-RODRIGUEZ, J. A. *et al.* Genetic diversity and insecticide resistance during the growing season in the green peach aphid (Hemiptera: Aphididae) on primary and secondary hosts: a farm-scale study in Central Chile. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-13, 2014.

SALUSO, A. *et al.* An invasive pentatomid pest in Argentina: neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology, Londrina**, v. 40, n. 6, p. 704-705, 2011.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT: user's Guide**. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869p.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 223-234, 2000.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SILVA, F. A. C. *et al.* Feeding activity, salivary amylase activity, and superficial damage to soybean seed by adult *Edessa meditabunda* (F.) and *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 41, p.386-390, 2012.

SILVA, L. D. *et al.* Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) no Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 116-125, 2009.

SILVA, V. P. da. *et al.* Monitoramento do percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) por feromônio sexual em lavoura de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, n.11, p.844-852, 2014.

SILVA, W. M. *et al.* Status of pyrethroids resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2015.

SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 7-17, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Entomopathogens associated with soybean/wheat production systems in Brazil and Argentina. In: **SIP 35th Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology**, Foz do Iguaçu, p. 75, 2002.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 179-187, 2004.



SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide resistance to endosulfan, monocrotophos and methamidophos in the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.). **Neotropical Entomology**, v.30, n. 2 p.317-320, 2001.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Insecticide susceptibility of *Euschistus heros* (Heteroptera: Pentatomidae) in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.1209-1216, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 378-384, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* **Manual de Identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula*. **Journal of Insect Science**, v. 5, n. 23, 2005.

SOSA-GÓMEZ, D. R. *et al.* Variabilidade de resposta de subpopulações de *Euschistus heros* (F.) a mistura de tiametoxam e lambda-cialotrina. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, 32., São Pedro, São Paulo, **Resumos expandidos**. Londrina: Embrapa, 2011. p. 80-81.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F. Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, n. 24, v. 2, p.401-404, 1995.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO *et al.* **Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, p. 673-723, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.7, p.767-769, 2010.

SUN, J. T. *et al.* Microsatellites reveal a strong subdivision of genetic structure in Chinese populations of the mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **BMC Genetics**, v. 13, v. 8. 2012.

SUN, W. *et al.* genetic variation and geographic differentiation among populations of the nonmigratory agricultural pest *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acridoidea) in China. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 150, 2015.

TANG, X. T. *et al.* Microsatellite-based analysis of the genetic structure and diversity of *Aleurocanthus spiniferus* (Hemiptera: Aleyrodidae) from tea plants in China. **Gene**, v. 560, n.1, p.107-113, 2015.

TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v. 5, p. 232-242, 1949.

VALLE, G. E., *et al.* Population variability of *Bemisia tabaci* (Genn.) in different hosts. **Genetics and Molecular Research**, n. 4, p. 4615-24, 2013.

VALLONE, P. M. BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VAN OOSTERHOUT, C. V. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p. 535-538, 2004.

VIA, S. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 421-426, 1990.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna, 1999. Disponível em:  
<<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>>. Acesso em 20/01/2016.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996.

WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p. 6531-6535, 1990.

WILLRICH, M. M. *et al.* Evaluation of insecticides for control of nymph and adult southern green stink bugs, 2002. **Arthropod Management Tests** 28:F77, 2003. Disponível em:  
<<http://www.entsoc.org/Protected/AMT/AMT28/INDEX/ASP>>. Acesso em: 20/01/2016.

WILLRICH, M. M. *et al.* Laboratory and field evaluations of insecticide toxicity to stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Cotton Science**, v. 7, n. 4, p. 156-163, 2003.

ZHU, Y. C. *et al.* Variability in resistance related enzyme activities in field populations of the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 265-273, 2011.